

# Wirkmechanismen zur Gentoxizität von Methyleugenol und ausgewählter oxidativer Metaboliten sowie zur posttranslationalen Histondeacetylase-Modifizierung durch Polyphenole

---

Vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern

zur Verleihung des akademischen Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

genehmigte Dissertation

D 386

vorgelegt von

Diplom Chemikerin

Isabel Anna Maria Groh

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 23.05.2014

Betreuerin: Juniorprof. Dr. Melanie Esselen

Kaiserslautern 2014

*Für meine Familie*

*Am Ende wird alles gut.*

*Wenn es nicht gut wird, ist es noch nicht das Ende.*

[Oscar Wilde]

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 27.06.2012

Prüfungskommission:

Vorsitzender: **Prof. Dr. Werner R. Thiel**

1. Berichterstatter: **Juniorprof. Dr. Melanie Esselen**

2. Berichterstatter: **Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk**

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Mai 2011 bis Februar 2014 im Arbeitskreis von Frau Juniorprof. Dr. M. Esselen an der Technischen Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie.

Frau Junprof. Dr. Melanie Esselen danke ich für die Überlassung des interessanten Themas. Sie hat durch Ihre stetige Diskussionsbereitschaft und Ihre Unterstützung meine Arbeit sehr gefördert.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk für die Übernahme des Koreferates sowie für die Unterstützung.

Auch danke ich Herrn Prof. Dr. Werner Thiel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>2.THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....</b>	<b>- 3 -</b>
2.1 DIE DNA.....	- 3 -
2.1.1 DNA und Chromosomen.....	- 3 -
2.1.2 Schädigung der DNA .....	- 11 -
2.1.3 DNA-Doppelstrangbrüche .....	- 14 -
2.2 DER ZELLZYKLUS.....	- 19 -
2.3 ZELLZYKLUS-REGULATION, APOPTOSE UND GENOMISCHE INSTABILITÄT .....	- 23 -
2.4 TOPOISOMERASEN .....	- 34 -
2.4.1 Topoisomerase I .....	- 36 -
2.4.2 Topoisomerase II .....	- 40 -
2.4.3 Topoisomerasehemmsstoffe .....	- 45 -
2.4.3.1 Topoisomerasegifte.....	- 47 -
2.4.3.2 Katalytische Topoisomerase-Inhibitoren.....	- 53 -
2.5 HISTONDEACETYLASE (HDAC) .....	- 55 -
2.5.1 HDAC-Hemmstoffe .....	- 60 -
2.5.2 Posttranslationale HDAC-Modifikation .....	- 63 -
2.5.2.1 SUMO .....	- 63 -
2.5.2.2 HDAC-SUMOylierung .....	- 67 -
2.6 POLYPHENOLE .....	- 68 -
2.6.1 Chlorogensäure (CGA) .....	- 73 -
2.6.2 Genistein.....	- 74 -
2.6.3 (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) .....	- 75 -
2.7 ALKENYLBENZENE - METHYLEUGENOL .....	- 76 -
2.7.1 Vorkommen von Methyleugenol.....	- 76 -
2.7.2 Exposition mit Methyleugenol.....	- 78 -
2.7.3 Metabolismus von Methyleugenol.....	- 80 -
2.7.4 Toxizität von Methyleugenol.....	- 87 -
2.7.4.1 Akute Toxizität .....	- 87 -
2.7.4.2 Subchronische und chronische Toxizität .....	- 87 -
2.7.4.3 Zytotoxizität.....	- 88 -
2.7.4.4 Reproduktions- und Entwicklungstoxizität .....	- 89 -
2.7.4.5 Kanzerogenität und Gentoxizität .....	- 89 -

<b>3. PROBLEMSTELLUNG .....</b>	<b>- 92 -</b>
<b>4. UNTERSUCHUNG DER POSTTRANSLATIONALEN HISTONDEACETYLASE-MODIFIZIERUNG DURCH POLYPHENOLE .....</b>	<b>- 94 -</b>
4.1 ERGEBNISSE.....	- 94 -
4.1.1 <i>Etablierung eines geeigneten Zellmodells</i> .....	- 94 -
4.1.2 <i>Beeinflussung der Zellviabilität der HT29 Zellen nach Inkubation mit ausgewählten Polyphenolen</i> .....	- 95 -
4.1.3 <i>Beeinflussung der SUMO E1 Expression nach Inkubation mit Polyphenolen</i> .....	- 96 -
4.1.4 <i>Modulation der HDAC-Aktivität in HT29 Zellen</i> .....	102
4.1.5 <i>Beeinflussung der HDAC 1 Expression nach Inkubation mit den ausgewählten Polyphenolen</i> .....	103
4.1.6 <i>Einfluss der Polyphenole auf die direkte Substrat-Konjugation</i> .....	105
4.2 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION DER POSTTRANSLATIONALEN HISTONDEACETYLASE-MODIFIKATION DURCH POLYPHENOLE .....	107
<b>5. WIRKMECHANISMEN DER GENTOXIZITÄT VON METHYLEUGENOL UND AUSGEWÄHLTER OXIDATIVER METABOLITEN .....</b>	<b>111</b>
5.1 UNTERSUCHUNGEN DER WACHSTUMSHEMMENDEN EIGENSCHAFTEN VON METHYLEUGENOL (ME) UND OXIDATIVER ME-METABOLITEN .....	111
5.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR GENTOXIZITÄT .....	120
5.3 UNTERSUCHUNG ZUR BEEINFLUSSUNG DER HISTONDEACETYLASEAKTIVITÄT UND -EXPRESSION .....	135
5.4 UNTERSUCHUNG DER BEEINFLUSSUNG VON TOPOISOMERASEN .....	147
5.4.1 <i>Einfluss von Methyleugenol und den oxidativen Metaboliten auf die katalytische Aktivität der Topoisomerase I</i> .....	147
5.4.2 <i>Einfluss von Methyleugenol und den oxidativen Metaboliten auf die katalytische Aktivität der Topoisomerase II</i> .....	152
5.4.3 <i>Wirkung von Methyleugenol und den oxidativen Metaboliten auf zelluläre Topoisomerasen</i> .....	154
5.5 UNTERSUCHUNG DER BEEINFLUSSUNG DER γH2AX-EXPRESSION .....	164
5.6 BEEINFLUSSUNG DNA-SCHADEN-ASSOZIIERTER SIGNALKASKADEN .....	169
5.7 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION ZUM MECHANISMUS DER DNA-SCHÄDIGENDEN WIRKUNG VON PHENYLPROPANOIDEN .....	185
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>196</b>

<b>7. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>198</b>
7.1 ZELLKULTUR .....	198
7.1.1 Zelllinie .....	198
7.1.2 Auftauen von Zellen .....	198
7.1.3 Mediumwechsel .....	199
7.1.4 Subkultivieren (Passagieren) der Zellen .....	199
7.1.5 Einfrieren und Lagern von Zellen .....	201
7.1.6 Mykoplasmentest .....	201
7.1.7 Elimination von Mykoplasmen .....	203
7.1.8 Bestimmung der Zellzahl .....	204
7.2 INKUBATIONSVERFAHREN .....	207
7.3 UNTERSUCHUNG ZUR WACHSTUMSHEMMUNG (SULFORHODAMIN B-TEST) .....	209
7.4 EINZELZELLGELELEKTROPHORESE (COMET ASSAY) .....	212
7.5 STABILITÄTSUNTERSUCHUNG .....	218
7.6 PROTEINGEWINNUNG .....	219
7.7 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD .....	223
7.8 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE UND WESTERN BLOT .....	225
7.9 IMMUNPRÄZIPITATION .....	233
7.10 HDAC-AKTIVITÄTSMESSUNG .....	235
7.11 PLASMID-MAXIPRÄPARATION .....	237
7.12 RELAXATIONSASSAY .....	240
7.13 DEKATENIERUNGSASSAY .....	243
7.14 ICE-BIOASSAY .....	246
<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>XLVII</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>LII</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>LIII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	ATP bindende Kasette (" <i>ATP binding cassette</i> ")
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	<i>Adenomatous-polypsis-coli</i> -Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	" <i>antioxidant response element</i> "
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ATM	" <i>ataxia telangiectasia mutated</i> " Protein
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	" <i>ATM- and Rad3-related</i> " Protein
ATRIP	" <i>ATR-interacting</i> " Protein
BARD1	" <i>BRCA1 associated ring domain</i> " Protein
BAX	Protein, das die Apoptose fördert
BCRP	" <i>Breast Cancer Resistance</i> " Protein
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BgVV	Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
bidest.	bidestilliert
BMDL	" <i>benchmark dose lower confidence limit</i> "
BOC-Lys(AC)-AMC	tert-Butyloxycarbonyl-Nε-acetyl-L-lysin-7-amino-4-methylcoumarin
bp	Basenpaare
BRCA	" <i>breast cancer susceptibility gene</i> "
BRCT	" <i>BRCA1 C Terminus domain</i> "
BSA	Rinderserumalbumin (" <i>bovine serum albumin</i> ")



c-ABL	Tyrosinkinase " <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i> "
Caco-2 Zellen	humane Kolon-Adenokarzinomzelllinie
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDC	" <i>cell division cycle</i> "
CDK	zyklinabhängigen Kinasen (" <i>cyclin dependent kinase</i> ")
cEPA	konjugierte Eicosapentaensäure
CGA	Chlorogensäure
CHK	Checkpoint Kinasen
CHO-Zellen	Hamster Ovarien
CPT	Camptothecin
CREB	" <i>cAMP response element-binding</i> " Protein
Csd	Kernsubdomäne
CYP450	Cytochrom P450 Monooxygenase
Cys	Cystein
d	Durchmesser
dA	Desoxyadenosin
DAPI	4',6'-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dG	Desoxyguanosin
DIS-Komplex	" <i>death inducing signaling</i> " Komplex
DMEM	" <i>Dulbecco's Modified Eagle's</i> " Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (" <i>desoxyribonucleic acid</i> ")
DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DNA-PKcs	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiotreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
E1A	" <i>Adenovirus early region 1A</i> "

E2F	Transkriptionsfaktor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EGCG	(-)-Epigallocatechin-3-gallat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (" <i>epidermal growth factor</i> ")
EGTA	Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
Elk-1	" <i>ETS domain-containing</i> " Protein
<i>et al.</i>	und andere (" <i>et alii/ae</i> ")
EtBr	Ethidiumbromid
ETS	" <i>E26 transformation-specific</i> " Transkriptionsfaktor Familie
FADD	" <i>Fas- associated death domain</i> "
Fc-Region	" <i>fragment crystallizable</i> " Region
FDA	<i>The Food and Drug Administration</i>
FEMA	<i>The Flavor and Extract Manufacturers Association</i>
FEMA	<i>Flavor and Extract Manufacturers Assoziation</i>
FHA-Domäne	" <i>forkhead-associated</i> " Domäne
FKS	fetales Kälberserum
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung [m/s <sup>2</sup> ]
G-Phase	" <i>Gap</i> "-Phase
GRAS	" <i>Generally Recognized As Safe</i> "
GSH	Glutathion
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
H2AX	Histon 2AX
HAT	Histonacetyltransferase
Hda1	" <i>DnaA-related</i> " Protein
HDAC	Histondeacetylase

HDAg	<i>"Hepatitis delta antigen"</i>
HDM-2	siehe MDM2
HeLa Zellen	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIPK2	<i>"homeodomain-interacting protein kinase 2"</i>
His	Histidin
HIV	humane Immundefizienz-Virus ( <i>"human immunodeficiency virus"</i> )
HMG	<i>"High mobility group"</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>"high-performance liquid chromatography"</i> )
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSp	Hitzeschockprotein ( <i>"heat shock protein"</i> )
HT29	humane Kolon Adenokarzinomzelllinie
i.p.	intraperitoneal
IC50	Konzentration einer Substanz, die eine 50%ige Inhibierung im Vergleich zur Kontrolle zeigt
ICE	<i>"Isolating in vivo complexes of enzyme to DNA"</i>
ICRF-187	Dexrazoxane
IP	Immunpräzipitation
I $\kappa$ B $\alpha$	<i>"nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha"</i>
Kap.	Kapitel
kDA	Kilodalton
kDNA	Kinetoplasten Desoxyribonukleinsäure
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
Ku70	<i>"Lupus Ku autoantigen protein p70"</i>
Ku80	<i>"Lupus Ku autoantigen protein p80"</i>
L	Liter

lat.	lateinisch
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LD	Letale Dosis
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LMA	<i>"Low melting agarose"</i>
LNCaP	humane Prostatakrebszellen
LOAEL	<i>"lowest observed adverse effect level"</i>
Lsg.	Lösung
Lys	Lysin
M	Molarität
mA	Milliamper
MDC1	<i>"Mediator of DNA damage checkpoint 1"</i>
MDM2	<i>"mouse double minute 2 homolog"</i>
Mdm3	<i>"mouse double minute 3 homolog"</i>
ME	Methyleugenol
ME-3'-N2-dG	N2-(transmethyloisoeugenol-3'-yl)-2'-deoxyguanosin
MEE	Methyleugenol-2',3'-epoxid
MET	Protoonkogen
mg	Milliogramm
min	Minute
Mio	Million
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MMC	Mitomycin C
MOE	<i>"Margin of Exposure"</i>
M-Phase	Mitose-Phase
MPOS	(N-Morpholino)propansulfonsäure
MRA	<i>"Mycoplasma Removal Agent"</i>
Mre11	Doppelstrangbruch-Reparaturprotein

MRN-Komplex	Proteinkomplex aus Mre11, Rad50 and Nbs1
MRP	<i>"multidrug resistant protein"</i>
MS	Massenspektrometer
MW	Mittelwert
MYC	Myelocytomatose
n.d.	nicht detektierbar
N2-MIE-dA	<i>N6</i> -(trans-methylsioeugenol-3'-yl)-2'-desoxyadenosin
N2-MIE-dG	<i>N2</i> -(trans-methylsioeugenol-3'-yl)-2'-desoxyguanosin
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NBS1	Nibrin
NBS1	<i>"Nijmegen breakage"</i> Syndrom
NEMO	<i>"NF-kappaB essential modulator"</i>
NF $\kappa$ B	Kernfaktor kappa B
nm	Nanometer
NMA	<i>"Normal melting agarose"</i>
NOEL	<i>"No observed effect level"</i>
Noxa	<i>"Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1"</i> (Schaden: lat. "Noxa")
NTP	<i>National Toxicology Program</i>
OT	Objektträger
OTF	<i>"Octamer transcription factor"</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
p16-Protein	zyklin-abhängiger Kinaseinhibitor 2A
p21-Protein	zyklin-abhängiger Kinaseinhibitor 1
p27	zyklin-abhängiger Kinaseinhibitor 1B
p53	Tumorsuppressorprotein p53
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBBK-Modell	<i>"physiologically based biokinetic model"</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>"phosphate buffered saline"</i> )

PCNA	<i>"Proliferating cell nuclear"</i> Antigen
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
pg	Pikogramm
pH	<i>"pondus Hydrogenium"</i>
PIKK	Gruppe der Phosphatidylinositol-3-Kinase-verwandte Kinasen
PK	Positivkontrolle
PKC	Proteinkinase C
PML	<i>"Promyelocytic leukemia"</i> Protein
POD	PML onkogene Domäne
ppm	<i>"parts per million"</i>
pRb	Retinoblastom-Protein
pRH	primäre Rattenhepatozyten
PUMA	<i>"p53 upregulated modulator of apoptosis"</i>
Rad50	DNA-Reparaturprotein
Rad51	DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturprotein
RanGAP1	<i>"Ran GTPase-activating protein 1"</i>
RAS	<i>"rat sacroma"</i>
RB	Retinoblastom
RbAp48	Retinoblastoma protein-assoziiertes Protein 48
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>"ribonucleic acid"</i> )
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>"reactive oxygen species"</i> )
RP	Umkehrphasen ( <i>"reversed phases"</i> )
RPA	<i>"replication protein A"</i>
Rpd3	<i>"Reduced Potassium Dependency"</i>
Runx	Runt-abhängiger Transkriptionsfaktor
SAE	SUMO-aktivierendes Protein
SCCNFP	<i>Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-food products intended for Consumers</i>
SCF	<i>Scientific Committee on Food</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>"sodium dodecyl sulfate"</i> )

SENP	SUMO-spezifischen Proteasen
Ser	Serin
Sir2	Sirtuin 2
SIRT1	Gen Sir2
Smad7	Protein, das die Transkription fördert (" <i>small mothers against decapentaplegic</i> ")
SMC	" <i>structural maintenance of chromosomes</i> "
Sp 1	Transkriptionsfaktor (" <i>specificity protein 1</i> ")
S-Phase	Synthese-Phase
SQE-Motif	Aminosäuresequenz am C-terminalen Histoneende
SRB	Sulforhodamin B
STABW	Standardabweichung
SULT	Sulfotransferasen
SUMO	" <i>Small ubiquitin like modifier</i> "
T/C	" <i>test over control</i> "
T25	Dosis, bei der im Tierversuch die Tumorzinzidenz 25% bei lebenslanger Exposition beträgt
TA	Trichostatin A
Tab.	Tabelle
TBS-T	Puffergemisch aus " <i>Tris-Buffered Saline</i> " und " <i>Tween 20</i> "
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris- und EDTA- Puffer
Thr	Threonin
TI	Schweifintensität (" <i>tail intensity</i> ")
Topo	Topoisomerase
T-Segment	Transport-Segment
Tyr	Tyrosin
Ubc9	SUMO-konjugierendes Enzym
UDS	" <i>unscheduled DNA Synthesis</i> "

UV	Ultraviolett
V	Volt
V79 Zellen	Lungenfibroblasten des männlichen chinesischen Hamsters
WST-1	<i>"water soluble tetrazolium salt 1"</i>
XRCC4	DNA-Reparaturprotein ( <i>"X-ray repair cross-complementing protein 4"</i> )
$\gamma$ H2AX	H2AX Histon
$\lambda$	Wellenlänge
°C	Grad Celsius
$\mu$ L	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
3'-OH-MiE	3'-Hydroxymethylisoeugenol
3'-Oxo-MiE	3'-Oxomethylisoeugenol
53BP1	p53-gebundenes Protein ( <i>"p53- binding protein"</i> )



# **1. Einleitung**

Krebserkrankungen stellen eine der häufigsten Todesursachen in westlichen Industrieländern dar. Neben genetischer Disposition und Umweltfaktoren, scheinen Ernährungsgewohnheiten, besonders bei der Entstehung von Tumoren im Gastrointestinaltrakt, eine große Rolle zu spielen [Rafter *et al.*, 2004]. In den letzten Jahren hat sich das Gesundheitsbewusstsein in den westlichen Industrieländern stark verändert, hierbei kommt der Prävention von Krebserkrankungen ein großer Stellenwert zu. Im Hinblick auf eine mögliche Krebsprävention sind sogenannte „sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe“ in den Fokus des Interesses gerückt. Zahlreiche Studien zeigen, dass diese Verbindungen, insbesondere Polyphenole, das Tumorwachstum hemmen [Kern *et al.*, 2005; Kern *et al.*, 2007; Barth *et al.*, 2005; Cooke *et al.*, 2006]. Viele der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe sind durch ihre Wirkungen auf epigenetische Faktoren wie z.B. die Acetylierung / Deacetylierung von Histonen mit positiven gesundheitlichen Aspekten assoziiert. Jedoch stellen solche Prozesse auch Eingriffe in die DNA-Integrität dar, weshalb im Hinblick einer vollständigen Nutzen-/Risikoabschätzung auch die Frage nach gesundheitlich nachteiligen Effekten gestellt werden sollte.

Sekundäre Pflanzenstoffe aus der Klasse der Alkenylbenzene kommen in verschiedenen Kräutern und Gewürzen wie Basilikum, Fenchel, Sternanis und Muskatnuss vor [Gardner *et al.*, 1997; Jeurissen *et al.*, 2006; NTP, 2000]. In Form natürlicher ätherischer Öle findet z.B. das Alkenylbenzen Methyleugenol in der Lebensmittelindustrie als Aroma- und Geschmacksstoff in Kaugummis, Eiscreme, Bonbons sowie in der Kosmetikindustrie als Duftstoff für Cremes und Parfum Verwendung [Smith *et al.*, 2002]. Die Forschung beschäftigt sich bereits seit einigen Jahren mit der Risikobewertung von Methyleugenol und anderen Alkenylbenzenen. Methyleugenol wurde bereits auf Grund seiner Wirkung in Tierversuchen von dem "Scientific Committee on Food" als gentoxisches Kanzerogen eingestuft [NTP, 2000; SCF, 2001]. In einigen Studien wurde gezeigt, dass die metabolische Aktivierung von Methyleugenol und damit auch die gebildeten oxidativen Metaboliten eine wichtige Rolle für die Toxizität spielen und somit auch in der Risikobewertung von Methyleugenol berücksichtigt werden sollten [Gardner *et al.*, 1997; Jeurissen *et al.*, 2006; Cartus *et al.*, 2012].

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen zum einen posttranslationale Modifikationen der Histondeacetylase durch Polyphenole und zum anderen die Untersuchung der Wirkmechanismen der Genotoxizität von Methyleugenol und ausgewählter oxidativer Metaboliten.

## **2.Theoretische Grundlagen**

### **2.1 Die DNA**

#### **2.1.1 DNA und Chromosomen**

Die Nukleinsäuren gelten als die Schlüsselmoleküle des Lebens, da sie die genetische Information enthalten. Die Nukleinsäuren sind chemisch gesehen Polynukleotide, die aus heterozyklischen Basen, Kohlenhydrat-Bausteinen und Phosphorsäure aufgebaut sind. Es wird zwischen den Desoxyribonukleinsäuren (DNA), welche 2-Desoxyribose als Kohlenhydrateinheit enthalten, und Ribonukleinsäuren (RNA) mit Ribosebausteinen unterschieden. Dieser chemische Unterschied führt biologisch gesehen zu einer unterschiedlichen Funktion: die DNA enthält das genetische Material, während die RNA an der Biosynthese der Proteine beteiligt ist. Die Beweise, dass die DNA die genetische Information trägt, haben die klassischen Experimente zur Transformation von Bakterien nach Avery, MacLeod und McCarty 1944 geliefert. Röntgenstrukturanalysen in den 1950er Jahren zeigten, dass die DNA aus zwei Strängen aufgebaut ist, die in einer Schraube aufgewunden ist - der sogenannten Doppelhelix oder Watson-Crick-Struktur (Abb.1) [Karlson *et al.*, 1994; Alberts *et al.*, 2004; Watson, 1973].



Abb.1: DNA-Struktur, Watson-Crick-Struktur  
[Watson, 1973]

Die DNA ist wie bereits beschrieben aus Desoxyribonukleotiden zusammengesetzt. Dabei sind die einzelnen Dinukleotide durch Phosphodiesterbrücken zwischen dem C-Atom 3' des einen und dem C-Atom 5' des nächstfolgenden Desoxyribonukleotids verknüpft. In der DNA kommen ausschließlich die Purinbasen Adenin und Guanin sowie die Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin vor. Die Purin- und Pyrimidinbasen sind immer über eine glykosidische Bindung an das C-Atom 1' der Desoxyribose gebunden (Abb.2) [Löffler, 1999].

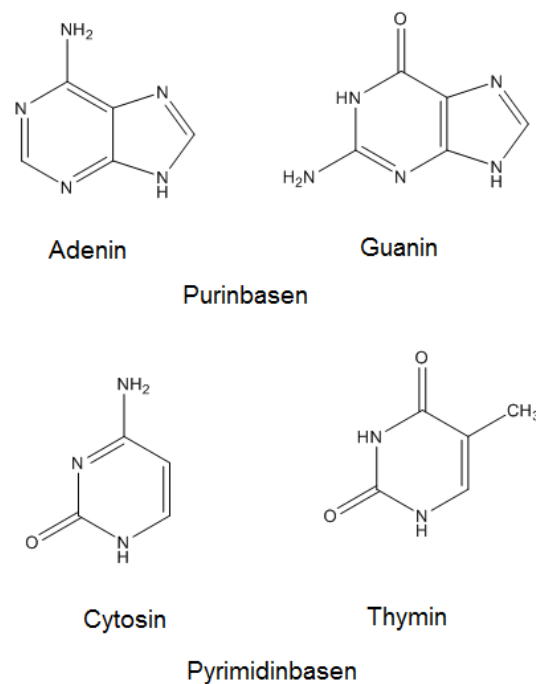


Abb.2: Die Purin- und Pyrimidinbasen der DNA  
[in Anlehnung an Löffler, 1999]

Die genetische Information ist in der DNA als Sequenz der Basen codiert. Die Übertragung der Information beruht auf dem Prinzip der Basenpaarung: jede Base bestimmt eindeutig ihre korrespondierende Base und legt damit die Basenfolge im neu synthetisierten Strang fest. Die Aneinanderlagerung der Nukleinsäuren durch Paarung komplementärer Basen führt zur Raumstruktur der Doppelhelix. Zwischen den Basen Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin bilden sich Wasserstoffbrücken aus. Das durch die Verknüpfung von Zucker und Phosphat gebildete negativ geladene Rückgrat der beiden Doppelstränge ist nach außen orientiert, während die hydrophoben Basen nach innen gerichtet sind. Die beiden Zuckerphosphat-Rückgrate winden sich umeinander und formen so die Doppelhelix.

mit einer vollständigen Drehung nach zehn Basenpaaren. Die Glieder eines jeden Basenpaars können nur dann zusammenfinden, wenn die beiden Stränge der Doppelhelix antiparallel verlaufen, das heißt, dass die 5'-3'-Richtung in einem Strang umgekehrt verläuft wie im anderen (Abb.3) [Karlson *et al.*,1994; Alberts *et al.*, 2004; Löffler, 1999].

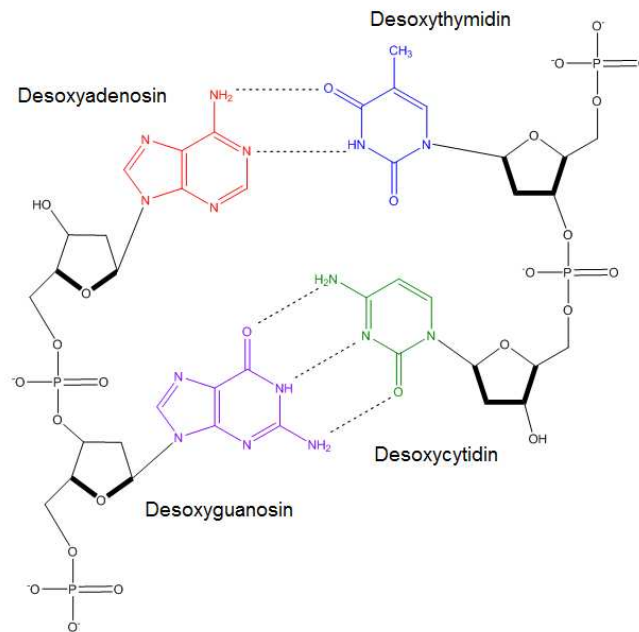


Abb.3: Die Basenpaarung der DNA  
[in Anlehnung an Alberts *et al.*, 2004]

Der DNA-Gehalt von Säugerzellen liegt je nach Spezies zwischen vier und acht pg/Zelle. Angenommen die gesamte DNA einer menschlichen Zelle läge als lineares Makromolekül vor, so hätte sie eine Länge von 1,8 m [Löffler, 1999].

Prokaryonten tragen ihre Gene auf einem einzigen DNA-Molekül, welches ringförmig und stark gefaltet im Zytoplasma vorliegt. Hingegen ist die DNA bei Eukaryoten im Kern auf einen Satz unterschiedlicher Chromosomen verteilt. Das Genom des Menschen ist (circa  $3,2 \times 10^9$  Nukleotide) auf 24 unterschiedliche Chromosomen aufgeteilt. Dabei besteht jedes Chromosom aus einem einzigen, sehr langen linearen DNA-Molekül und angelagerten Proteinen, die den DNA-Doppelstrang zu einem verdichteten Gebilde falten. Dieser Komplex aus DNA und Proteinen wird Chromatin genannt. Chromatin lässt sich noch weiter in Heterochromatin und Euchromatin

aufteilen. Im Heterochromatin liegt die DNA dichter gepackt vor, es ist transkriptionell inaktiv. Hingegen ist das Euchromatin weiter gepackt und Teile des Chromatins sind transkriptionell aktiv. Die Form des Chromatins hängt hierbei von der DNA- bzw. Histonmodifikation ab. Im Chromatin liegt die DNA überwiegend als Komplex mit Histonen vor (Abb.4).

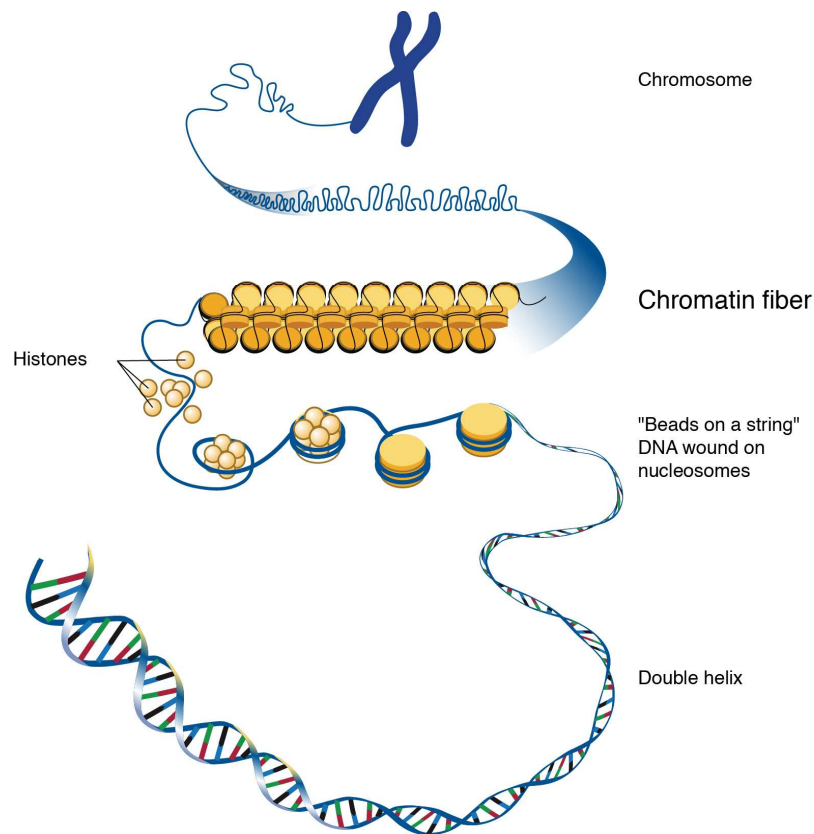


Abb.4: Chromatin  
[www.gonome.gov; Darryl Leja, NHGRI]

Es werden fünf verschiedene Histonklassen unterschieden: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Die Histonproteine H2A und H2B sowie H3 und H4 liegen als Dimere vor. Je vier derartige Dimere bilden ein oktameres, scheibenförmiges Nukleosomencore. Die DNA windet sich in einer Länge von 146 Basenpaaren um das Core-Partikel mit 1,8 Windungen, wobei das Nukleosom entsteht (Abb.5).

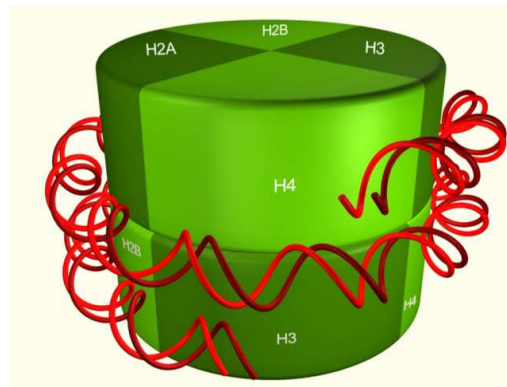


Abb.5: Das Nukleosom

Die Histonproteine H2A und H2B sowie H3 und H4 liegen als Dimere vor; die DNA windet sich um das Nukleosom.

[modifiziert nach Alberts *et al.*, 2004]

Die Verbindungs-DNA, sogenannte Linker, zwischen den Nukleosomen ist circa 20 bis 80 Basenpaare lang und mit dem Histon H1 assoziiert (Abb.6). Durch die Bindung von H1 an den Linker wird das Histonoktamer nun vollständig mit der DNA umwunden. Dies wird als Chromatosom bezeichnet und es enthält das Histonoktamer, 166 Basenpaare sowie Histon H1 (Abb.6). Die so entstandene Nukleosomenkette bildet eine 30 nm lange Struktur, die dadurch entsteht, dass sich die Nukleosomenfaser wie auf einer Spule mit etwa sechs Nukleosomen je Windung aufwickelt. Diese Faser faltet sich mit Proteinen des Zellkerns, den sogenannten Nicht-Histonproteinen, zur schleifenförmigen Domäne. Zu den Nicht-Histonproteinen, auch HMG-Proteine ("*high mobility group*") genannt, werden alle im Chromatin mit der DNA, den Histonen oder der neugebildeten RNA assoziierten Proteine gerechnet, welche in der Chromatin-Präparation enthalten sein können. Dazu gehören auch DNA- und RNA-Polymerasen, Regulationsfaktoren und Gerüstproteine.

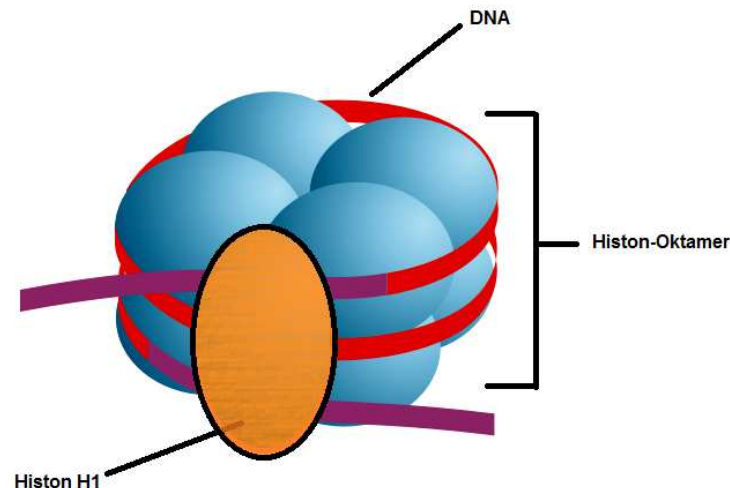


Abb.6: Das Chromatosom

Die Verbindungs-DNA (Linker) ist mit dem Histon H1 verbunden, dadurch wird das Histonoktamer vollständig mit der DNA umwunden. Das Chromatosom setzt sich aus dem Nukleosom und dem Histon H1 zusammen.

[in Anlehnung an Alberts *et al.*, 2004]

Die Chromosomen stellen die "Transportform" der DNA dar. Streng genommen wird nur das Erbmaterial der Metaphase als Chromosom bezeichnet. In den anderen Phasen des Zellzyklus liegen die DNA-Moleküle als Chromatin vor. Der Name Chromosom rührt aus dem Griechischen "Farbkörper", da das Erbgut in der Metaphase gut anfärbbar ist und dadurch lichtmikroskopisch sichtbar wird (Abb.7). In Eukaryoten ist die DNA in Form von Chromosomen angeordnet. Mit Ausnahme der Geschlechtszellen (Gameten) und einiger weniger hoch spezialisierter Zellarten (zum Beispiel den roten Blutkörperchen) enthält jede somatische Zelle zwei Kopien eines jeden Chromosoms, eine von der mütterlichen und eine von der väterlichen Seite vererbt. Daher werden der somatische Chromosomensatz als diploid und der, der Gameten, als haploid bezeichnet. Die mütterlichen und väterlichen Chromosomen eines Paares werden als Homologe bezeichnet. Die Ausnahme bildet das Geschlechtschromosom bei Männern, welches aus dem Y-Chromosom des Vaters und des X-Chromosoms der Mutter vererbt wurde. Jede menschliche Zelle enthält insgesamt 46 Chromosomen, 22 bei Männern und Frauen gleiche Paare (Autosome) sowie zwei als Geschlechtschromosomen, die sogenannten Gonosomen [Löffler, 1999; Alberts *et al.*, 2004; Karlson *et al.*, 1994; Horn *et al.*, 2003].



A



B

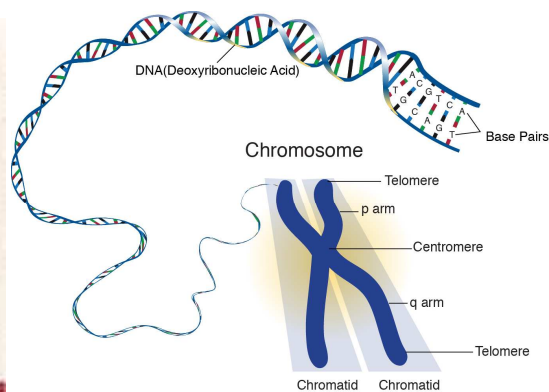


Abb.7: Chromosom

A: 46 humane Chromosomen der Frau unter dem Lichtmikroskop [www.tierklinik.de]

B: Schematischer Aufbau [www.genome.gov; Darryl Leja, NHGRI]

Die Chromosomen sind nur während der Zellteilung (Mitose) gut sichtbar zu machen. Die Darstellung der 46 Chromosomen während der Zellteilung wird als Karotyp des Menschen bezeichnet. Wenn Teile eines Chromosoms verloren gehen oder zwischen Chromosomen ausgetauscht werden, entstehen Chromosomenanomalien, welche mit vererbten Defekten oder bestimmten Krebsarten verbunden sind. Es wird zwischen fünf verschiedenen Chromosomenmutationen (auch Chromosomenaberrationen genannt) unterschieden (Abb.8) [Eisenbrand, 1994; Knippers, 1997; Eisenbrand *et al.*, 2006]:

1. Deletion: Abschnitte eines Chromosoms gehen verloren
2. Duplikation: Abschnitte eines Chromosoms werden vervielfacht werden
3. Inversion: Chromosomenabschnitte verdrehen sich um 180°
4. Insertion: ein anderes DNA-Stück baut sich in ein Chromosom ein
5. Translokation: ein Chromosomenstück verlagert sich von seinem ursprünglichen Ort auf ein anderes Chromosom

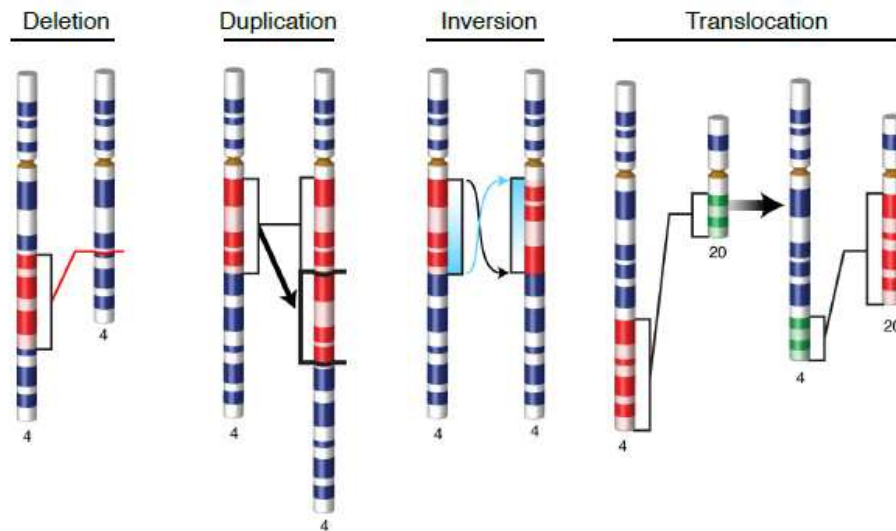


Abb.8: Möglichkeiten von Mutationen  
[modifiziert nach [www.genome.gov](http://www.genome.gov); Darryl Leja, NHGRI]

## 2.1.2 Schädigung der DNA

Die DNA einer Zelle ist einer Vielzahl von Einflüssen ausgesetzt, die eine Veränderung der molekularen Struktur der DNA zur Folge haben. Dabei wird zwischen endogenen Einflüssen, welche die intrazellulären Prozesse des Zellstoffwechsels beinhalten, und exogenen Einflüssen unterschieden (Abb.9). Ein typisches Beispiel für einen endogenen Einfluss sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS). ROS entstehen hauptsächlich durch die mitochondriale Atmungskette und durch inflammatorische Prozesse [Wei, 1998; Pero *et al.*, 1996]. Unter exogenen Einflüssen wird hingegen die Wirkung verschiedener genotoxischer Chemikalien oder der Einfluss ionisierende Strahlung verstanden. Aber auch bestimmte Lebensgewohnheiten wie Zigarettenrauchen oder Industriechemikalien oder Senfgas, welches zur Kriegsführung eingesetzt wurde, oder eine Vielzahl von Medikamenten, die in der Chemotherapie eingesetzt werden, zählen zu exogenen Einflüssen [Lord und Ashworth, 2012].

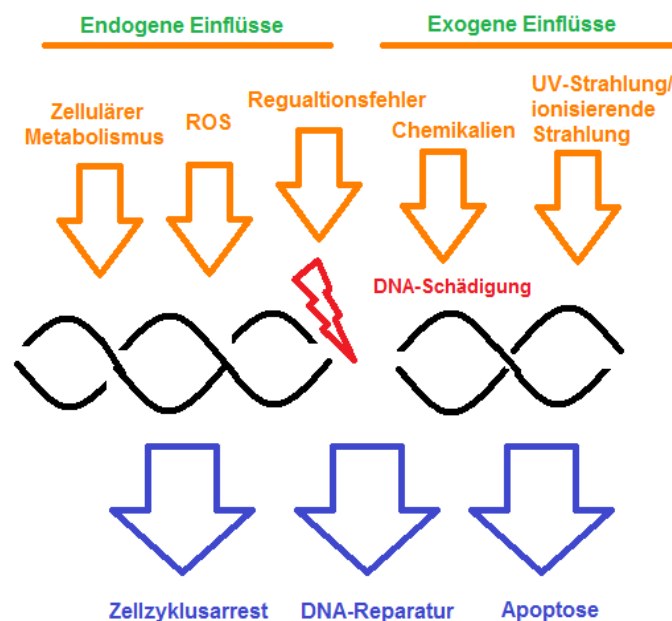


Abb.9: Die wichtigsten endogenen und exogenen Einflüsse und die möglichen zellulären Mechanismen der DNA-Reparatur  
 ROS: reaktive Sauerstoffspezies  
 [modifiziert nach Mountzios *et al.*, 2008]

Alle diese Einflüsse bewirken eine Schädigung der DNA. Hierbei wird zwischen verschiedenen DNA-Schäden wie Einzelstrangbruch, Doppelstrangbruch, DNA-Protein-Quervernetzung, Zuckerverlust, Zuckerschaden, Basenschaden und Mehrfachschaden unterschieden (Abb.10). Ein besonderer Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf den DNA-Doppelstrangbrüchen, die im nachfolgenden Kapitel genauer beschrieben werden.

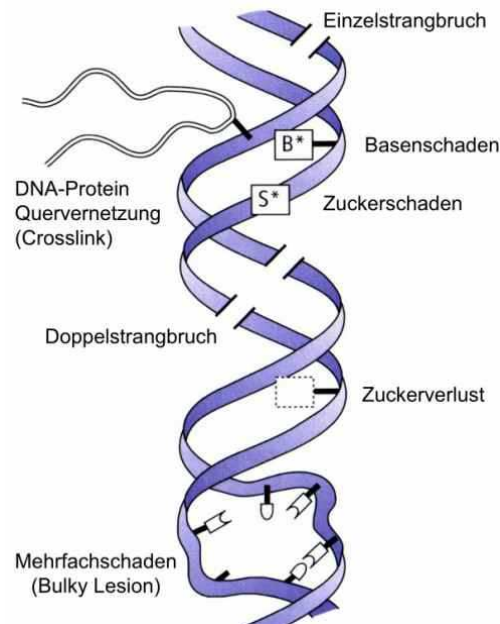


Abb.10: Verschiedene DNA-Schäden  
[[www.mi.fu-berlin.de](http://www.mi.fu-berlin.de); [www.umingo.de](http://www.umingo.de)]

Treten Schäden der DNA auf, wird die DNA-Schadensantwort von Sensorproteinen initiiert und das Signal durch Phosphorylierungsreaktionen über Transduktorproteine zu den Effektorproteinen weitergeleitet [Khanna und Jackson, 2001]. Zu den Effektorproteinen zählen Proteine der DNA-Reparaturmechanismen sowie Zellzykluskontrollproteine. Durch Aktivierung der Zellzykluskontrollpunkte wird der Eintritt der Zelle in die nächste Phase des Zellzyklus verhindert, so dass die Zelle den DNA-Schaden reparieren kann (Kapitel 2.2). Ist eine Reparatur nicht möglich, so wird der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet (Kapitel 2.3) [Lowndes und Murguia, 2000; Zhou und Elledge, 2000; Shiloh, 2003]. Die Zellzykluskontrollpunkte befinden sich am Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase zur S-Phase, innerhalb der S-Phase, zwischen der G<sub>2</sub>-Phase und der M-Phase sowie innerhalb der M-Phase des Zellzyklus.

Zwei Proteinkinasen ATM ("*ataxia telangiectasia mutated protein*") und ATR ("*ATM and Rad3-related*") spielen bei der Signaltransduktion nach einer DNA-Schädigung eine zentrale Rolle. ATM und ATR gehören zur Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinase ähnlichen Kinasen (PIKKs). Durch Phosphorylierung von Schlüsselproteinen geben sie das Signal der DNA-Schädigung an Effektorproteine weiter (Kapitel 2.3) [Shiloh, 2003].

### 2.1.3 DNA-Doppelstrangbrüche

Ein DNA-Doppelstrangbruch (DSB) liegt vor, wenn beide Stränge der DNA-Doppelhelix durch einen Bruch der kovalenten Bindung des Zucker-Phosphat-Rückgrades getrennt sind und damit die Watson-Crick-Basenpaarung unterbrochen ist. DNA-DSB sind im Vergleich zu Einzelstrangbrüchen, bei denen es nur in einem der beiden DNA-Stränge zum Bruch kommt, für die Zelle schwieriger zu reparieren. Einerseits können sich bei einem DSB die beiden freien DNA-Enden räumlich voneinander trennen, andererseits kann die komplementäre Sequenz beider DNA-Schäden verloren gehen. Kommt es nun zu keiner oder fehlerhaften Reparatur der DNA, so kann dies zum Zelltod oder zur chromosomalen Veränderung führen, welche die Entstehung von Tumorerkrankungen begünstigt [Khanna und Jackson, 2001; Hoeijmakers, 2001; Van Gent *et al.*, 2001].

Die Reparatur eines DNA-DSB kann über zwei Wege erfolgen, zum einen die Homologe Rekombination ("*homologous recombination*") und zum anderen die nicht-homologe Endverknüpfung ("*non-homologous end joining*") [Haber, 2000; Khanna und Jackson, 2001; Jackson, 2002; Lord und Ashworth, 2012]. Bei der Homologen Rekombination wird der DSB von einem MRN-Komplex erkannt. An die Bruchenden bindet das Einzelstrang-Bindeproteine RPA ("*replication protein A*"). Die Rekombinasen Rad51 und BRCA2 ("*breast cancer susceptibility gene 2*") tauschen die RPA aus, wodurch es zur Stranginvasion des Nukleoprotein-Filaments in den DNA-Doppelstrang der ungeschädigten Schwesterchromatide kommt. Das 3'-Ende der geschädigten DNA wird mit Hilfe der Matrize des ungeschädigten Strangs durch die Polymerase I verlängert. Durch Ligase I kommt es zur Schließung der offenen DNA-Enden (Abb.11).

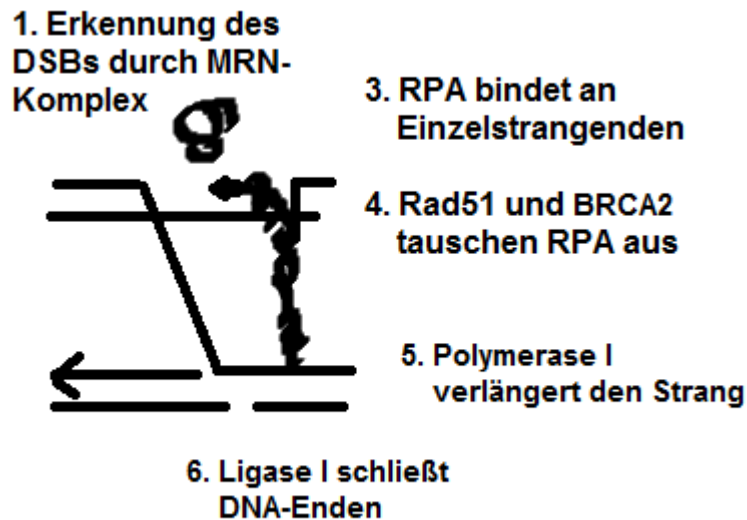


Abb.11: Homologe Rekombination  
 RPA: "*replication protein A*"; BRCA2: "*Breast cancer susceptibility gene 2*"  
 [in Anlehnung an Junran *et al.*, 2005; Pichierri *et al.*, 2000; Peng und Lin, 2011]

Bei der Nicht-homologen Endverknüpfung bindet das Ku70/Ku80 Heterodimer, welches zum System der DNA-abhängigen Kinasen gehört und sich aus den Untereinheiten mit dem Molekulargewicht von 70 und 83 kDa zusammensetzt, an die freien Bruchenden (Abb.12) [Dyran und Yoo, 1998]. Hierdurch wird die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK<sub>cs</sub>) rekrutiert. DNA-PK<sub>cs</sub> bildet zusammen mit dem Ku70/Ku80 Heterodimer das aktive DNA-PK-Holoenzym. Dieses wiederum aktiviert Serin/Threonin-Kinasen und bewirkt eine Autophosphorylierung. DNA-PK-Holoenzym aktiviert weiter den XRCC4/LigaseIV-Komplex, der die Strangbrüche verschließt.

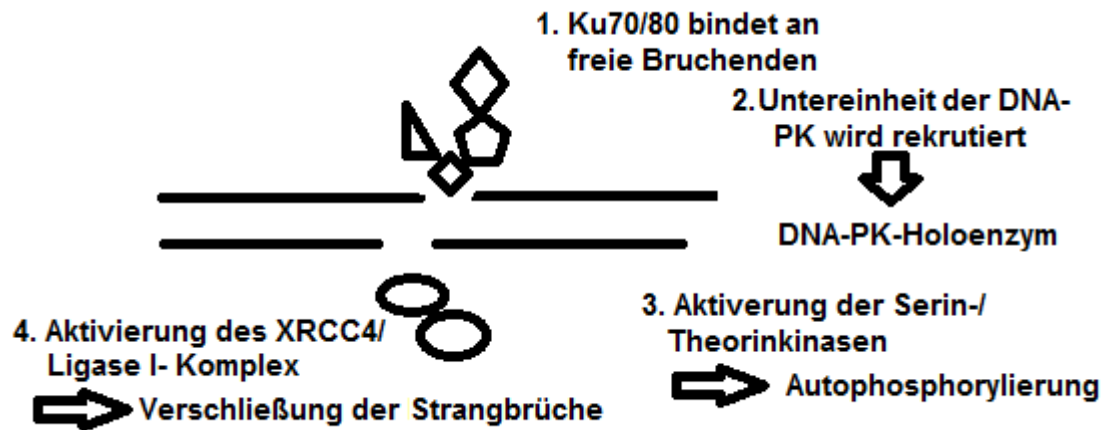


Abb.12: Nicht-homologe Endverknüpfung

DNA-PK: DNA-abhängige Proteinkinase; XRCC4: "X-ray repair complementing protein 4"  
 [in Anlehnung an Junran *et al.*, 2005; Pichierri *et al.*, 2000; Peng und Lin, 2011]



## Gamma H2AX

Die Histon H2A-Familie kann in drei Subfamilien H2A1-H2A2, H2AZ und H2AX gegliedert werden [Redon *et al.*, 2002]. Im Vergleich zu den beiden anderen Subfamilien der H2A-Familie unterscheidet sich H2AX in dem sogenannten SQE-Motif. Darunter wird eine hoch konservierte Aminosäuresequenz am C-terminalen Histoneende aus Serin, Glutamin und Glutaminsäure verstanden [Mannironi *et al.*, 1989]. Die Bedeutung als Biomarker für DNA-Doppelstrangbrüche beruht auf der Phosphorylierung des H2AX Histons ( $\gamma$ H2AX) als Schadensantwort. Die Phosphorylierung des Histons am Serin 139 ist einer der ersten Schritte in der Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche [Modesti und Kanaar, 2001]. Die Phosphorylierung wird von ATM und ATR katalysiert [Burma *et al.*, 2001; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002; Ward und Chen, 2001; Furuta *et al.*, 2003] (Abb.13). Wie bereits beschrieben, liegt im C-terminalen Histoneende das Serin 139 (SQE Motif), welches als Substrat für die Phosphorylierung gilt. Es kommt zu einer starken Akkumulation an  $\gamma$ H2AX-Molekülen an den Doppelstrangbrüchen, den sogenannten  $\gamma$ H2AX-Foci [Rogakou *et al.*, 1998]. Diese  $\gamma$ H2AX-Foci führen zur Akkumulation weiterer Foci an DNA-Doppelstrangbrüchen; darunter fallen Proteine wie BRCA1 ("*breast cancer susceptibility gene 1*"), 53BP1 ("*p53-binding protein*"), MDC1 ("*mediator of DNA damage-checkpoint 1*"), Rad51 und MRN-Komplex [Paull *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2000; Goldberg *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2003; Bekker-Jensen *et al.*, 2006]. Die Akkumulation der  $\gamma$ H2AX-Foci an den DNA-Doppelstrangbrüchen macht es möglich, mit Hilfe geeigneter Antikörpern diese immunfluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen.  $\gamma$ H2AX wird daher als Surrogatmarker für DSB verwendet.

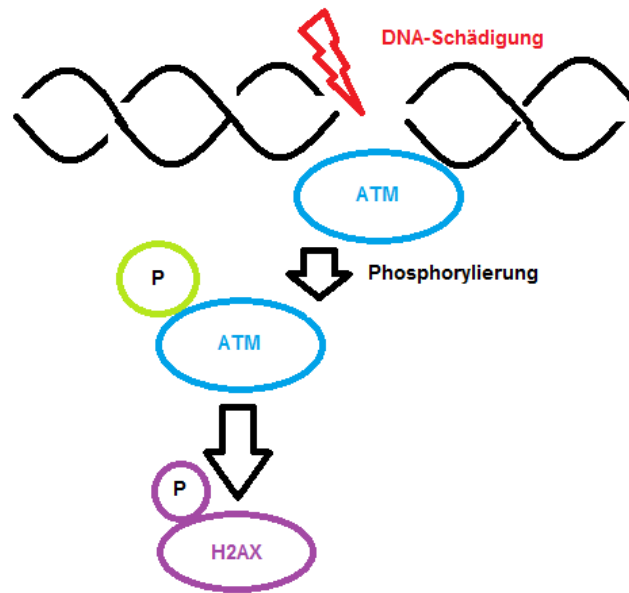


Abb.13: Aktivierung von gammaH2AX (γH2AX)

Durch einen DNA-DSB wird ATM phosphoryliert; dieses wiederum führt zur Phosphorylierung von H2AX (γH2AX). Es kommt zur Akkumulation von γH2AX-Molekülen an den Doppelstrangbrüchen (γH2AX-Foci). Daher dient γH2AX als Surrogatmarker für DSB.

DNA: Desoxyribonukleinsäure; ATM: "*ataxia telangiectasia mutated protein*"; H2AX: Histon 2AX  
[in Anlehnung an Burma *et al.*, 2001; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002]

## 2.2 Der Zellzyklus

Der grundlegende Mechanismus, durch den Zellen proliferieren, wird Zellzyklus genannt. Eine Zelle teilt sich durch eine bestimmte Abfolge von Ereignissen, während derer sie zunächst ihre DNA und Organellen verdoppelt und sich dann zweiteilt. Die Funktion des Zellzyklus ist die Weitergabe der Erbinformation an die nächste Generation. Dazu muss zunächst die DNA jedes Chromosoms fehlerfrei verdoppelt werden und anschließend die beiden Kopien aufgeteilt werden, so dass zwei genetisch identische Tochterzellen entstehen können. Diese Vorgänge erfolgen in den beiden wichtigsten Phasen des Zellzyklus der S- und der M-Phase (Abb.14).

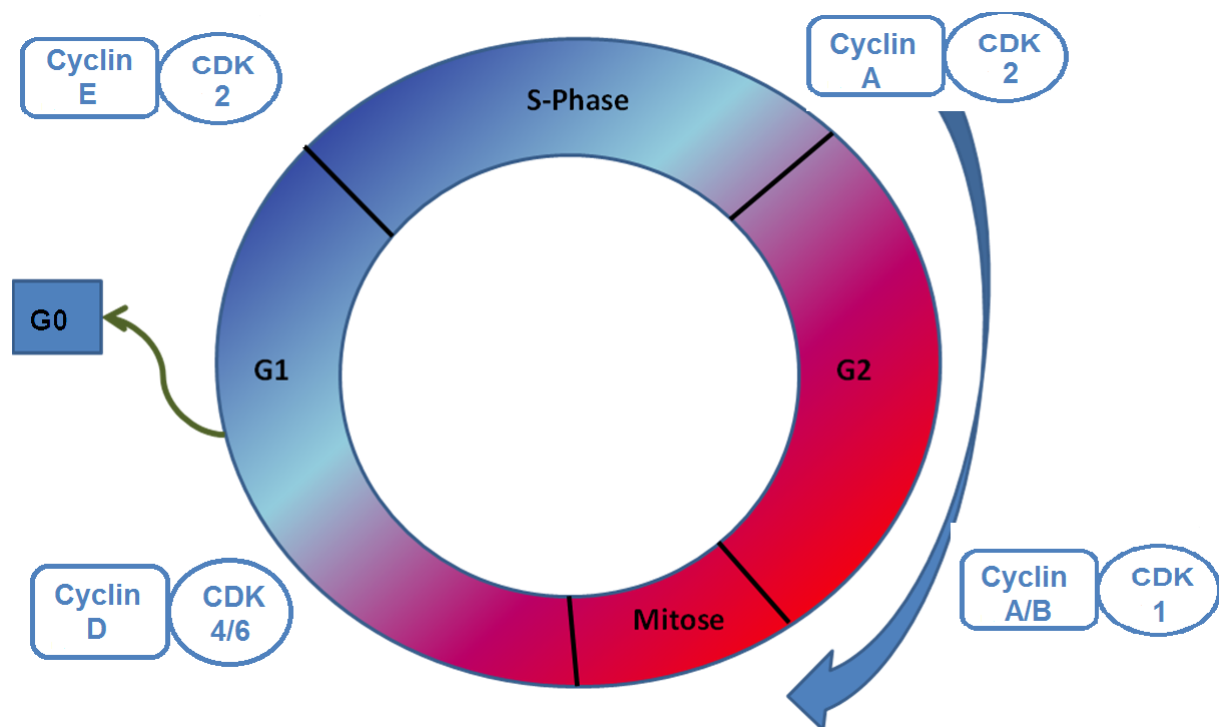


Abb.14: Zellzyklusverlauf  
 G-Phase: "Gap"-Phase; S-Phase: Synthese-Phase; CDK: zyclin-abhängige Kinase  
 [in Anlehnung an Alberts *et al.*, 2004 und Eisenbrand *et al.*, 2005]

Während der S-Phase wird die DNA verdoppelt. Diese Phase dauert etwa 10 bis 12 Stunden und beträgt in Säugerzellen etwa die Hälfte der gesamten Zellzykluszeit. Nach der S-Phase erfolgt die M-Phase, in der die Chromosomentrennung und Zellteilung erfolgen (circa eine Stunde dauert dieser Vorgang). Die M-Phase enthält auch den wohl wichtigsten Vorgang die Mitose, bei der die Teilung des Zellkerns erfolgt. Die Mitose ist selbst in verschiedene Phasen unterteilt. In der ersten Phase der Mitose, die Prophase, beginnt die Chromosomenkondensation und die Spindelfasern beginnen sich zu organisieren. Danach folgt die Prometaphase; hier zerfällt die Kernhülle in ihre Bestandteile und die verdoppelten Chromosomen, von denen jedes aus zwei Schwesterchromatiden besteht, werden an die Mikrotubuli der Mitosespindel geheftet. In der darauffolgenden Metaphase findet die Ausrichtung der Chromosomen am Äquator der Mitosespindel statt. Mit der Trennung der Schwesterchromatide beginnt die Anaphase, während derer sich die Chromosomen in Richtung der entgegengesetzten Spindelpole bewegen. In der Telophase wird die Zelle von einem kontraktilen Ring aus Aktin eingeschnürt. Eine neue Kernhülle bildet sich und das Chromatin lockert sich auf. Durch die Teilung des Zytoplasmas, Zytokinese, und die Verteilung der Organellen wird die Zellteilung vollendet.

In den meisten Zellzyklen sind zusätzliche Zwischenperioden eingeschoben, die sogenannten G- oder Gap-Phasen: eine  $G_1$ -Phase zwischen M-Phase und S-Phase sowie eine  $G_2$ -Phase zwischen der S-Phase und der Mitose.  $G_1$ , S und  $G_2$  werden zusammen auch als Interphase bezeichnet. Die G-Phasen dienen hierbei nicht nur als Verzögerungselement, sondern geben der Zelle auch Zeit den Ablauf des Zellzyklus durch verschiedene Signale von innerhalb oder außerhalb zu kontrollieren. So sind Zellen in der Lage, das Durchlaufen der  $G_1$ -Phase zu verlängern oder sogar in die  $G_0$ -Phase, den eigenen Ruhezustand der Zelle (z.B. bei ausdifferenzierten Zellen), einzutreten. Sind die Signale für Wachstum jedoch günstig, so durchlaufen die Zellen von einem frühen  $G_1$  oder auch von  $G_0$  aus einen sogenannten Restriktionspunkt, wodurch die Zelle auf die DNA-Replikation festgelegt wird, selbst wenn die extrazellulären Wachstums- und Teilungssignale wegfallen [Alberts *et al.*, 2004; Karlson *et al.*, 1994].

Damit sich die Zellen nicht willkürlich und ungeregt teilen, unterliegt der Zellzyklus einem Kontrollsystem. Das intrazelluläre Kontrollsystem wird durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren beeinflusst. Wachstumsfaktoren sind dabei nicht nur für das Wachstum der Zelle wichtig, sondern auch für deren Differenzierung und Spezialisierung. Bei den Wachstumsfaktoren handelt es sich hauptsächlich um Proteine, einige wenige sind auch Steroide. Bislang sind über 50 Wachstumsfaktoren bekannt.

Da es sich bei den meisten Wachstumsfaktoren um Proteine handelt, die nicht die Zellmembran passieren können, sind sie häufig an spezifische Rezeptoren gekoppelt. Durch Bindung der Wachstumsfaktoren an den entsprechenden Rezeptor wird eine Signalkaskade aktiviert, die zur Transkription proliferations-assoziiierter Gene führt. Hierdurch erfolgt eine Phosphorylierung verschiedener Proteine bzw. Enzyme (verschiedene Kinasen), was eine Proliferation begünstigt. Die Aktivität dieser Kinasen ist von Zyklinen abhängig, woher auch die Namensgebung der zyklinabhängigen Kinasen (CDKs) stammt. Die Zykline D und E spielen eine besondere Rolle bei der Überwindung des Restriktionspunktes (Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase zur S-Phase). Die Zykline (CycD) bilden zusammen mit ihren CDKs 4 und 6 den D-Zyclin/CDK4/6-Kinasekomplex, welcher als wichtiges Ziel das RB-Protein hat. Das RB-Protein, ein Zellkern-Protein auch als RB-105 bezeichnet, wird von Beginn der G<sub>1</sub>-Phase schrittweise phosphoryliert ("RB" leitet sich von Retinoblastom ab; bei diesem Tumor wurde dieses Protein (Tumorsuppressor) entdeckt). Durch einen weiteren Zyclin-CDK-Komplex, den E-Zyclin/CDK2-Komplex, kommt es zur weiteren Phosphorylierung und damit ist der Restriktionspunkt erreicht. Das phosphorylierte RB-Protein setzt den Transkriptionsfaktor E2F frei, welcher zur Aktivierung der ihm zugehörigen Gene führt. Diese Gene codieren hauptsächlich Proteine, welche für die beginnende S-Phase notwendig sind. EGF2 steigert zum Beispiel die Expression der Zykline E und A sowie der MYC-Proteine. Das MYC-Protein ist ein Transkriptionsfaktor, welcher wiederum Gene aktiviert, die das Zellwachstum fördern (in Tumorzellen ist das MYC-Protein meist überexprimiert; Proto-Onkogen) [Horn *et al.*, 2003; Bonelli *et al.*, 2014].

Der weitere Ablauf des Zellzyklus wird durch Zykline und den CDKs reguliert und kontrolliert. Zyklin B übernimmt die Kontrolle der CDK1 und führt die Zelle von der G<sub>2</sub>-Phase in die Mitosephase. Verschiedene Proteine werden von CDK1 phosphoryliert, so dass es zu einem Zerfall der Kernmembran kommt und das Zytoskelett reorganisiert wird. Am Ende der Mitose wird Zyklin B durch Ubiquitinierung und Proteasomen abgebaut.

Bestimmte Proteine sind in der Lage die CDKs zu hemmen und somit die Progression des Zellzyklus zu verhindern. So auch das p16-Protein- es inhibiert den D-Zyklin/CDK4/6-Komplex und damit die Phosphorylierung von RB. Folglich bleibt E2F gebunden und die S-Phase wird nicht eingeleitet. Ein anderes Beispiel ist das p21-Protein. p21 liegt in der G<sub>1</sub>-Phase als Komplex vor, der aus D-Zyklin, CDK4 und CDK6 sowie einer Untereinheit der DNA-Polymerase  $\delta$  besteht. Ebenso ist p21 in der G<sub>2</sub>-Phase von besonderer Bedeutung; hier wird über eine vermehrte Expression von p21 der p53-vermittelte-G<sub>2</sub>-Arrest vermittelt (siehe Kap. 2.3). Ein weiteres Inhibitorprotein der CDKs ist das p27-Protein. p27 spielt bei der Regulation des Ein- und Ausgangs der G<sub>0</sub>-Phase eine besondere Rolle, da es zur Hemmung der Zyklinen D und E führt [Horn *et al.*, 2003; Daniel, 2003].

## **2.3 Zellzyklus-Regulation, Apoptose und Genomische Instabilität**

Eingriffe in die Mechanismen der Zellzyklus-Regulation, DNA-Reparatur und Apoptose führen zur genomischen Instabilität. Organismen haben im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, die die genomische Integrität durch Zellzyklusarreste nach einer aufgetretenen DNA-Schädigung aufrechterhalten. Diese Kontrollmechanismen erlauben der Zelle, die DNA zu reparieren oder bei einer zu starken Schädigung der DNA die Apoptose einzuleiten. Defekte an diesen Kontrollmechanismen führen zur genomischen Instabilität und damit auch zur Entartung von Zellen und so zur Entstehung von Krebs [Motoyama und Naka, 2004]. Eine wichtige Funktion spielen hierbei die sogenannten Tumorsuppressorproteine. Zwei besonders wichtige Tumorsuppressorproteine sind p53 sowie das Retinoblastomprotein pRB, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Die Proteinkinasen ATM und ATR, sowie die nachregulierten Substratproteine Chk1 und Chk2 ("*Checkpoint Kinasen*") spielen eine wichtige Rolle als Marker für eine vorliegende Schädigung der DNA. ATM wurde erstmals 1995 als 370 kDa schwere Proteinkinase charakterisiert [Savitsky *et al.*, 1995]. ATM hat eine Vielzahl an Substraten und viele zelluläre Prozesse werden durch ATM beeinflusst [Kastan und Lim, 2000]. Histon H2AX, ATRIP ("*ATR-interacting protein*") und BRCA1 fungieren als Adapter bei der Rekrutierung von ATM und ATR [Motoyama und Naka, 2004]. Sowohl ATM als auch ATR gehören zur Gruppe der Phosphatidylinositol-3-Kinase-verwandte Kinasen (PIKK), einer Familie von Proteinkinasen, welche eine Vielzahl weiterer Proteine reguliert; darunter auch die Kinasen Chk1 und Chk2, die die Funktion der Kontrollpunktaktivierung im Zellzyklus als Reaktion auf eine DNA-Schädigung haben [Shiloh, 2003]. Histon H2AX und BRCA1 sind ebenso Zielstrukturen von ATM und ATR-vermittelter Phosphorylierung und übertragen das Signal der DNA-Schädigung zu weiterregulierenden Molekülen wie Chk1 und Chk2 [Motoyama und Naka, 2004]. Die Forschung an ATM und ATR ist besonders auf den Effekt dieser Proteinkinasen auf die Zellzykluskontrollpunkte gerichtet. Der Zellzyklus kann an verschiedenen Stufen oder Punkten unterbrochen werden und die Zelle kann arretieren. Meist wird der Zellzyklus vor der S-Phase oder während der S-Phase (auch bekannt als G<sub>1</sub>/S-Arrest bzw. -Kontrollpunkt) oder vor der Mitose (G<sub>2</sub>-

Arrest bzw. -Kontrollpunkt) bei einer Schädigung der DNA unterbrochen [Kastan und Lim, 2000].

Der wichtigste Schritt im **G<sub>1</sub>/S-Kontrollpunkt** ist die Stabilisierung und Aktivierung von p53, was die Transkription des p21 Gens induziert und damit die Hemmung des Zyklin E-CDK2 Komplexes (Abb.15). p53 ist ein sehr wichtiges Protein, welches auch als "Wächter des Genoms" bezeichnet wird. Es ist wie pRb (Retinoblastom-Protein) im Zellkern lokalisiert und hat ein Molekulargewicht von 53 kDa [Horn *et al.*, 2003]. Hingegen zu RB wird die Funktion von p53 nicht nur über den Phosphorylierungsgrad, sondern auch über die Konzentration bestimmt. Signale, die p53 beeinflussen, hängen mit der Interaktion von p53 und seinem Gegenspieler MDM2 ("*mouse double minute 2 homolog*") zusammen. Das MDM2 Onkogen ist eine Ringfingertyp Ubiquitin Ligase, welche sowohl MDM2 als auch p53 ubiquitinyliert. Die Bindung an den N-Terminus von p53 führt zur Ubiquitinylierung von p53 und folglich zur Degradation durch das 26S Proteasom. ATM hängt mit der Regulation von p53 zusammen im Hinblick auf die direkte Phosphorylierung von p53 an Ser-15. Dies führt zur Unterbrechung der p53-MDM2 Interaktion und damit zur Anreicherung von p53. Diese Konzentrationszunahme löst auch die Anreicherung von p21 aus. Das p21 Protein bindet CDKs (wie bereits oben beschrieben) und hemmt die Phosphorylierung von Retinoblastomprotein pRb. Normalerweise besteht die Funktion von pRb darin, die Transkriptionsfaktoren für den Übergang in die S-Phase zu binden und zu inaktivieren. Erst durch Phosphorylierung von pRb werden die Transkriptionsfaktoren freigesetzt und der Zellzyklus kann fortschreiten. Wird die Phosphorylierung von pRb gehemmt, so kann die Zelle nicht von der G<sub>1</sub>-Phase in die S-Phase übergehen [Löffler, 1999]. ATM phosphoryliert auch MDM2 an Ser-395, was zu einer Behinderung des Transports des MDM2-p53 Komplexes aus dem Zellkern führt. Außerdem phosphoryliert ATM die Tyrosin Kinase c-ABL an Ser-465; die aktivierte c-ABL führt weiter zur Stabilisierung von p53, in dem sie MDM2 an Tyr-394 phosphoryliert [Goldberg *et al.*, 2002]. Weiter phosphoryliert ATM Chk2 an Thr-68 und führt zur Oligomerisierung von Chk2, in dem eine spezifische Bindungsstelle für die FHA Domäne eines anderen Chk2 Moleküls gebildet wird [Xu *et al.*, 2002; Ahn *et al.*, 2002]. Die Homodimerisierung von Chk2 ermöglicht die *trans*-Phosphorylierung der C-terminalen Kinase Domäne (Thr-383, Thr-387), welche für die vollständige Aktivierung von Chk2 verantwortlich ist. Chk2 formt einen stabilen Komplex mit p53 und aktiviert p53 durch Phosphorylierung (Ser-20 in Menschen) [Falck *et al.*, 2001;



Hirao *et al.*, 2002; Takai *et al.*, 2002]. Chk2 scheint essentiell für die Aktivierung von p53 als Antwort auf die Schädigung der DNA zu sein und damit führt Chk2 zu einem G<sub>1</sub>-Arrest durch p53 [Hirao *et al.*, 2002; Takai *et al.*, 2002]. In Tab.1 sind die phosphorylierten Zielenzyme zur G<sub>1</sub>-Arretierung im Überblick aufgelistet.

Tab.1: Auflistung der phosphorylierten Zielenzyme zur G<sub>1</sub>-Arretierung

Substrat	Position	zelluläre Antwort	Literatur
p53	Ser-15	Anreicherung von p53 Anreicherung von p21	Löffler, 1999
pRB		Inaktivierung der Transkriptionsfaktoren für Übergang zur S-Phase	Löffler, 1999
MDM2	Ser-395	Transport von MDM-2-p53-Komplex ↓	Goldberg <i>et al.</i> , 2002
cABL	Ser-465	Stabilisierung von p53	Goldberg <i>et al.</i> , 2002
MDM2	Tyr-394	Stabilisierung von p53	Goldberg <i>et al.</i> , 2002
CHK2	Thr-68	Oligomerisierung von CHK2	Xu <i>et al.</i> , 2002 Ahn <i>et al.</i> , 2002
C-terminale Domäne	Thr-383 Thr-387	Aktivierung von CHK2	Falck <i>et al.</i> , 2001
p53	Ser-20	G <sub>1</sub> -Arrest	Hirao <i>et al.</i> , 2002 Takai <i>et al.</i> , 2002

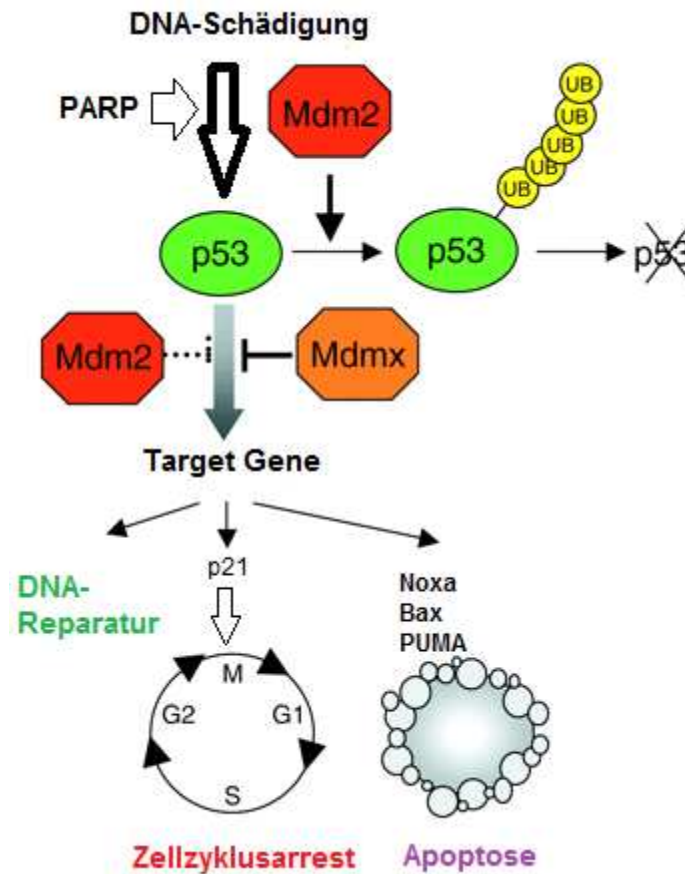


Abb.15: Signalweg von p53

Nach DNA-Schädigung phosphoryliert ATM MDM2; es kommt zur Stabilisierung von p53. Danach Aktivierung von p21 und Zellzyklusarrest oder DNA-Reparatur oder Apoptose  
 MDM2: "mouse double minute 2 homolog"; PARP: Poly(ADP-ribose)-Polymerase; UB: Ubiquitin  
 [in Anlehnung an Marine *et al.*, 2006]

Zwei Signalwege spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des **intra-S Kontrollpunktes**: zum einen der ATM-Chk2-CDC25A und zum anderen der ATM-NBS1-SMC1 (NBS- "*Nijmegen breakage syndrome*"; SMC- "*structural maintenance of chromosomes*") Signalweg (Abb.16). Die Phosphatase CDC25A ("*cell division cycle 25 A*") aktiviert durch Dephosphorylierung an Thr-14 und Tyr-15 CDK2, welches für die DNA Synthese erforderlich ist. Durch ATM aktiviertes Chk2 wird CDC25A an Ser-123 phosphoryliert, was zum Abbau über den Ubiquitin-Protease Signalweg führt und damit zum Stopp des Zellzyklusverlaufs in der S-Phase. Eine andere Möglichkeit der intra-S Kontrollpunkt-Aktivierung ist die Phosphorylierung von NBS1 an Ser-343 durch ATM. SMC1 wird an Ser-957 und Ser-966 durch ATM in Abhängigkeit von NBS1 (Nibrin 1) phosphoryliert und führt zur Aktivierung des intra-S Arrestes. Die Mediatorproteine 53BP1 ("*p53 binding protein*"), BRCA1 und MDC1 ("*Mediator of DNA-damage checkpoint*") tragen auch zur Aktivierung des intra-S Arrestes bei, jedoch ist der genaue Mechanismus bislang noch ungeklärt [Hirao *et al.*, 2002; Takai *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Yazdi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002; Sorensen *et al.*, 2003]. BRCA1 ist ein Phosphoprotein, welches in etwa 50% der vorkommenden Brust- und Eierstockkrebsarten mutiert ist [Nomizu *et al.*, 1997]. BRCA1 beinhaltet ein BRCT Motiv, das in verschiedenen DNA-Reparatur- und Zellzyklus-Proteinen detektiert wird [Callebaut und Morion, 1997]. Es wird davon ausgegangen, dass BRCA1 mit Rad51 (ein essentielles Protein bei der DNA Reparatur) einen Komplex formt. Jedoch kann die Wirkung von ATM auf BRCA1 direkt oder indirekt sein, da Chk2 ebenso BRCA1 phosphoryliert [Scully *et al.*, 1997; Kastan und Lim, 2000; Gowen *et al.*, 1998; Moynahan *et al.*, 1999; Gartei *et al.*, 2001]. Eine andere Möglichkeit ist die Komplexbildung mit BARD1 ("*BRAC1 associated Ring domain 1*") [Fabbro *et al.*, 2004]. Die Heterodimerisierung schützt sowohl BRCA1 als auch BARD1 vor Degradation [Joukov *et al.*, 2001; Hashizume *et al.*, 2001]. In der Studie von Fabbro *et al.* wurde gezeigt, dass der Komplex aus BRCA1 und BARD1 eine Adapter Funktion für p53 ausübt, nachdem der Komplex an Ser-1423 und Ser-1524 durch ATM/ATR phosphoryliert wurde. BRCA1 ist notwendig für die Phosphorylierung an Ser-15 des p53 als Antwort auf eine DNA-Schädigung und damit auch wichtig für den G<sub>1</sub>/S- Kontrollpunkt [Fabbro *et al.*, 2004].

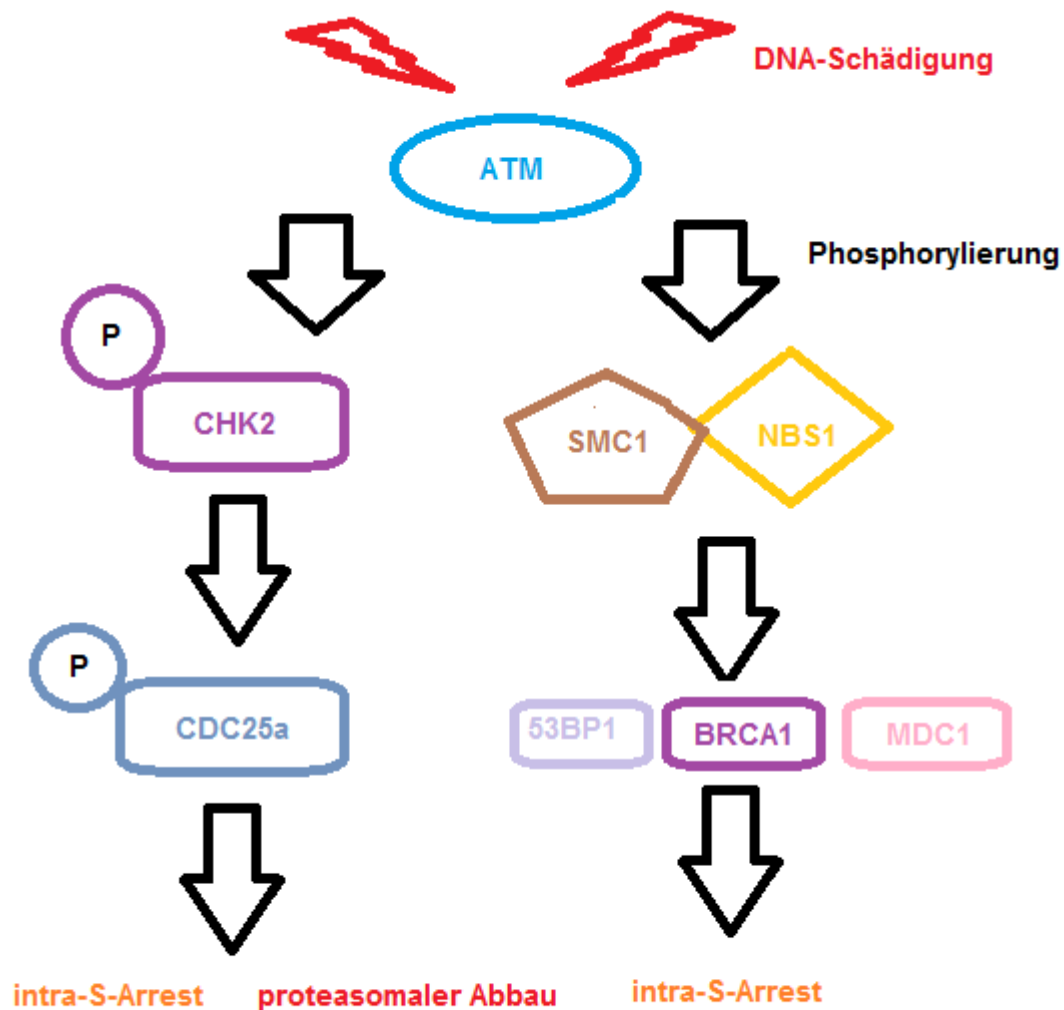


Abb.16: Aktivierung des intra-S-Kontrollpunktes

Nach DNA-Schädigung wird ATM aktiviert, was zum einen zur Phosphorylierung von CHK2 führt und damit zur Phosphorylierung von CDC25a und so zum intra-S-Arrest bzw. zum proteasomalen Abbau. Zum anderen führt die Aktivierung von ATM zur Phosphorylierung von SMC1 und NBS1 und damit zur Aktivierung der Mediatorproteine BRCA1, 53BP1 und MDC1, was ebenso zum intra-S-Arrest führt. ATM: "*ataxia telangiectasia mutated protein*"; CHK2: "*Checkpoint Kinase 2*"; CDC: "*Cell division cycle*"; SMC1: "*Structural maintenance of chromosomes*"; NBS1: Nibrin; 53BP1: "*p53 binding protein*"; MDC1: "*Mediator of DNA-damage checkpoint*"; BRCA1: "*breast cancer susceptibility gene 1*"

[Hirao *et al.*, 2002; Takai *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Yazdi *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002; Sorensen *et al.*, 2003]

Bei der Aktivierung des **G<sub>2</sub>-Kontrollpunktes** spielt die Inhibierung der Mitose-promoting Phosphatase CDC25C eine wichtige Rolle. ATM und ATR aktivieren Chk1, eine Serine/Threonin Kinase, durch Phosphorylierung an Ser-317 und Ser-345 (Abb.17) [Zou *et al.*, 2003]. Das aktivierte Chk1 phosphoryliert anschließend CDC25C an Ser-216 und formt so eine Bindungsmöglichkeit für das 14-3-3 Protein. Diese Interaktion mit dem 14-3-3 Protein unterdrückt die CDC25C Dephosphorylierung und aktiviert den mitotischen Kinasekomplex Zyklin B-Cdc2, welcher den Eintritt geschädigter Zellen in die Mitose verhindert [Brown und Baltimore, 2003; Blackwood *et al.*, 2013]. ATM phosphoryliert auch Chk2, welche wiederum wie Chk1 CDC25C phosphoryliert [Kastan und Lim, 2000]. BRCA1, eine Zielstruktur von ATM, Chk1 und Chk2, führt ebenso zu einem G<sub>2</sub>-Arrest, da wie bereits beschrieben Chk1 CDC25C phosphorylieren kann und damit einen G<sub>2</sub>-Arrest auslöst [Mailand *et al.*, 2000; Kastan und Lim, 2000; Yarden *et al.*, 2002; Foray *et al.*, 2003].

γH2AX ist essentiell für die Rekrutierung von Reparaturfaktoren wie 53BP1, BRCA1, MDC1 und des MRE11-RAD50-NBS1 Komplexes auf die Seite des DNA-Schadens [Celeste *et al.*, 2003; Bassing *et al.*, 2002; Celeste *et al.*, 2002]. Zellen von Mäusen, die kein H2AX Gen besitzen, haben einen Defekt im G<sub>2</sub>-Kontrollpunkt [Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002]. 53BP1 ist ein sehr wichtiger Mediator des DNA-Schädigung-Signals, der für den Zellzyklusarrest während der G<sub>2</sub>-Phase verantwortlich ist [Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002; DiTullio *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002]. 53BP1 bindet an p53, Chk2 sowie BRCA1 und reguliert die Phosphorylierung [Ward *et al.*, 2003]. In einer Studie von Zhang *et al.* wurde gezeigt, dass p53 auch in der Lage ist über den ATM/Chk2-Signalweg einen G<sub>2</sub>-Arrest auszulösen [Zhang *et al.*, 2013]. Auch Wahl *et al.* beschreibt für p53 verschiedene Mechanismen, die sowohl zu einen G<sub>1</sub>/S als auch zu einem G<sub>2</sub>/M-Arrest führen können [Wahl *et al.*, 2001]. Wie nachfolgend beschrieben hat p53 als Tumorsuppressorprotein nicht nur die Funktion der Zellzyklusregulation, sondern auch der Apoptose [Levine, 1997].

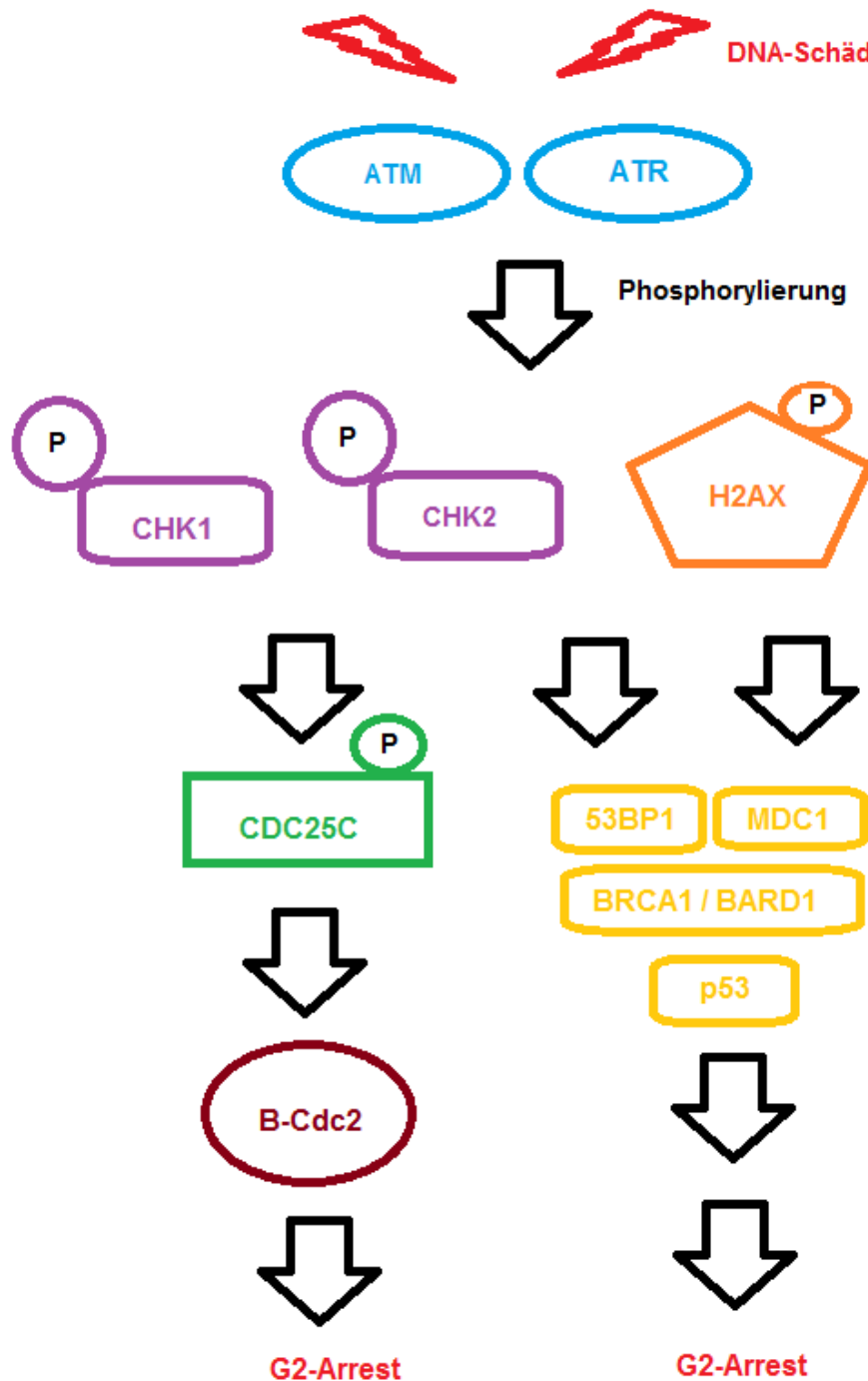


Abb.17: Aktivierung des G2-Kontrollpunktes

ATM und ATR werden nach DNA-Schädigung aktiviert und phosphorylieren CHK1, CHK2 und H2AX. Dies führt über Signalkaskaden zu einem G<sub>2</sub>-Arrest

ATM: "ataxia telangiectasia mutated protein"; ATR: "ATM-and Rad3-related"; CHK: "Checkpoint Kinase"; CDC: "Cell division cycle"; 53BP1: "p53 binding protein"; MDC1: "Mediator of DNA-damage checkpoint" ; BRCA1: "breast cancer susceptibility gene 1"; H2AX: Histon 2AX; BARD1: "BRCA1 associated Ring domain 1"

[modifiziert nach Kastan und Lim, 2000]

## Apoptose

Eine Reihe von Genen codieren Proteine, die den Durchlauf des Zellzyklus hemmen. Ihre physiologische Funktion beruht auf der Verhinderung der Proliferation der Zelle bei einer DNA-Schädigung. Durch die Möglichkeit der Arretierung an den Kontrollpunkten des Zellzyklus kann die Zelle entweder den DNA-Schaden reparieren oder die Apoptose, den programmierten Zelltod, einleiten. Die charakteristischen Merkmale der Apoptose, welche sie auch deutlich von der Nekrose unterscheiden, sind ein Schrumpfen der Zelle, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen. Die Plasmamembran bleibt intakt und anschließend wird der Inhalt der apoptotischen Zelle in membranumhüllte apoptotische Körperchen verpackt und durch Phagozytose von Makrophagen aufgenommen (Abb.18) [Jin und El-Deiry, 2005].

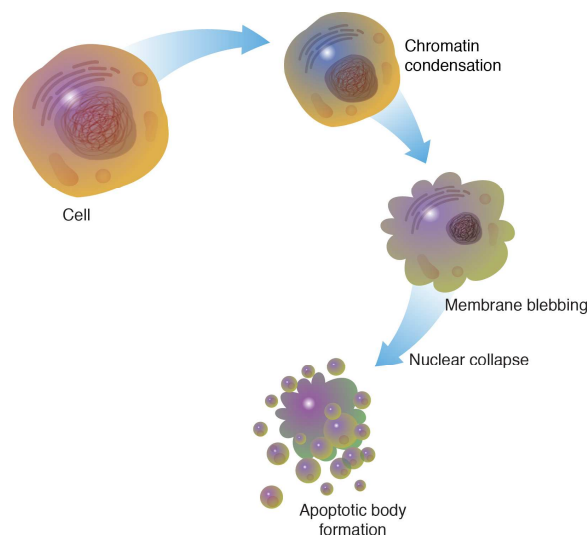


Abb.18: Ablauf des Apoptoseprozesses:  
Schrumpfen der Zellen; Chromatinkondensation; Bildung der Apoptotischen Körperchen  
[www.genome.gov; Darryl Leja, NHGRI]

Die Apoptose wird über zwei unterschiedliche Signalwege eingeleitet, den extrinsischen Weg ("Todesrezeptor"-Weg) und den intrinsischen Weg (mitochondrialen Weg) (Abb.19). Der extrinsische Signalweg wird eingeleitet durch Ligandenbindung (wie z.B. TNF $\alpha$ : Tumornekrosefaktor und andere Zytokine) an den sogenannten "Todesrezeptor" (z.B. CD25). Durch die Oligomerisierung des Rezeptors binden die Adaptermoleküle FADD ("*Fas-associated death domain*") und die proCaspase 8 und bilden zusammen den DIS-Komplex ("*death inducing signaling*"), der in der Aktivierung der Caspase 8 resultiert, wodurch die sogenannte Caspase-Kaskade ausgelöst wird. Der intrinsischen Weg der Apoptose kann durch Tumorsuppressorgene, wie p53, ausgelöst werden. p53 steigert die Genexpression des BAX-Gens, welches proapoptotisch wirksam ist und die Freisetzung von Cytochrom c fördert [Horn *et al.*, 2003; Rübber, 2009; Daniel, 2003]. Wie bereits beschrieben, ist Chk2 ein wichtiger Regulator der p53 Stabilität [Hirao *et al.*, 2002; Takai *et al.*, 2002]. Die Aktivierung von Chk2, welche mit der p53-vermittelten Apoptose zusammenhängt, ist sowohl über den ATM-abhängigen als auch -unabhängigen Weg reguliert (ATX) [Shiloh, 2003]. Nach einer DNA-Schädigung wird p53 aktiviert und führt zu einer Induktion von p53 Zielgenen, wie Noxa, BAX und Puma. Die Aktivierung dieser Proapoptotischen Gene hängt auch mit der Phosphorylierung von p53 an Ser-46 durch HIPK2 ("*homeodomain-interacting protein kinase 2*") zusammen. HIPK2 ist eine nukleare Serine-Threonin Kinase, die lokalisiert ist zu subnuklearen Strukturen auch bekannt als PML onkogene Domäne (PODs) [D'Orazi *et al.*, 2002; Hofmann *et al.*, 2002]. Die resultierende Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma führt zur Bildung eines Proteinkomplexes, des sogenannten Apoptosom, und stellt die aktive Form der Caspase 9 dar. Diese initiiert die Caspase-Kaskade. Durch sogenannte Effektorcaspasen (Caspase 3, 6 und 7) wird der apoptotische Tod der Zelle durchgeführt [Hengartner, 2000; Yuan *et al.*, 2000].



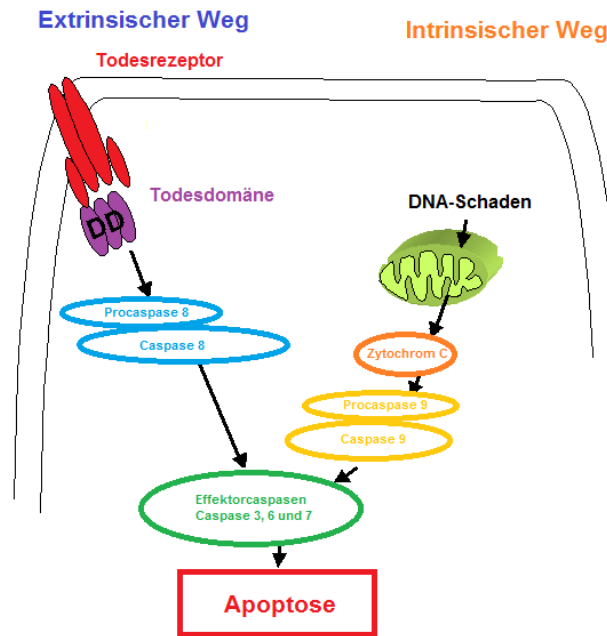


Abb.19: Schematischer Ablauf der extrinsischen und intrinsischen Signalkaskade der Apoptose  
[in Anlehnung an Löffler, 1999; Alberts *et al.*, 2004; Daniel, 2003]

## **2.4 Topoisomerasen**

Die DNA einer Zelle muss für sämtliche Vorgänge, wie Replikation, Transkription, Rekombination und Reparatur sowohl entwunden als auch wieder verdrillt werden. Die Regulation dieses topologischen Status der DNA wird durch die sogenannten Topoisomerasen festgelegt. Durch Einfügen von Strangbrüchen, Hindurchführen von anderen Strängen, Verdrillungen und Verknotung katalysieren diese Enzyme Änderungen in der DNA-Topologie [Boege, 1996; Keck und Berger, 1999; Corbett und Berger, 2004].

Auf Grund ihrer strukturellen Eigenschaften und des Wirkmechanismus werden Topoisomerasen in vier Klassen unterteilt (Tab.2). Enzyme der Typ I Familie erzeugen einen transienten Einzelstrangbruch und werden wiederum in Typ IA und IB unterteilt. Typ IA relaxieren DNA, in dem sie einen Strang schneiden und den komplementären Strang hindurchführen und danach den DNA-Bruch verschließen. Topoisomerasen der Klasse I benötigen hierzu kein ATP (Adenosindiphosphat). Die Veränderung der Verwindungszahl erfolgt dabei immer in Einer-Schritten pro Reaktion. Hingegen können Enzyme vom Typ IB mehrere Drehungen der Duplex-DNA um die Phosphodiesterbindung durchführen und so die Verwindungszahl um mehrere Einheiten pro Reaktion verändern [Corbett und Berger, 2004]. Topoisomerasen der Typ II Familie induzieren Doppelstrangbrüche in der DNA. Die Einteilung in weitere Untergruppen erfolgt hier durch die strukturellen Bedingungen [Champoux, 2001]. Typ IIA schneiden die zwei DNA-Stränge der Doppelhelix und bilden einen Topoisomerase-DNA-Komplex. Durch diesen Komplex wird ein weiterer Doppelstrang hindurchgeführt und der DNA-Doppelstrangbruch wird unter ATP Verbrauch wieder verschlossen. Die Topoisomerasen besitzen jedoch eine Gemeinsamkeit: die kovalente Bindung des Enzyms an die DNA erfolgt über eine Tyrosin-Phosphodiester-Brücke [Corbett und Berger, 2004].

Tab.2: Vorkommen der Topoisomerasen

Topoisomerase Typ	Vorkommen
IA	<i>E. coli</i> Topoisomerase I und III, Hefe Topoisomerase III, Topoisomerase III $\alpha/\beta$ von Säugetierzellen
IB	Topoisomerase I aus Hefen und Säugerzellen, Topoisomerase V aus <i>Methanopyrus kandleri</i>
IIA	<i>E.coli</i> DNA-Gyrase, Topoisomerase IV, Topoisomerase II in Hefen, Topoisomerase II $\alpha/\beta$ von Säugerzellen
IIB	Topoisomerase VI von <i>Archae</i> -Bakterien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nur die Topoisomerase I (aus der Klasse IB) und die Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$  (aus der Klasse IIA) untersucht, auf die nun im Folgenden näher eingegangen wird.

## 2.4.1 Topoisomerase I

Die Topoisomerasen vom Typ IB sind monomere Enzyme, welche weder ATP noch  $Mg^{2+}$ -Ionen als Cofaktor benötigen, um superspiralisierte DNA zu relaxieren. Typ IB Topoisomerasen haben eine Größe zwischen 80-100 kDa [Berger, 1998; Interthal *et al.*, 2001]. Die humane Topoisomerase I, die ein Zellkern lokalisiertes Protein darstellt, besteht aus 756 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 91 kDa [Steward *et al.*, 1996; Champoux, 2001]. Diese Topoisomerase wird auf dem Chromosom 20q12-13.2 codiert [Juan *et al.*, 1988]. In der Promoterregion dieses Gens finden sich die Bindungsstellen für "*cAMP-responsive-element-binding-protein*" (CREP/ATF), "*octamer transcription factor*" (OTF), Sp 1 oder NF- $\kappa$ B [Larson und Gobert, 1999].

Bei der Topoisomerase I handelt es sich um ein Phosphoprotein, welches durch Serin/Threonin-Kinasen wie zum Beispiel Proteinkinase C phosphoryliert wird und damit aktiv vorliegt [Pommier *et al.*, 1990; Larsen und Gobert, 1999; Yu *et al.*, 2004]. Eine Dephosphorylierung führt demzufolge zur Inaktivierung des Enzyms, das heißt, dass die Topoisomerase I nicht in der Lage ist, superspiralisierte DNA zu relaxieren. Ein reversibler Aktivitätsverlust kann auch durch eine poly-ADP-Ribosylierung erfolgen. Diese Hemmung der Topoisomerase I tritt auf, wenn ein DNA-Strangbruch vorliegt und dieser Schaden repariert wird [Larsen und Gobert, 1999].

Die humane Topoisomerase I setzt sich aus vier Domänen zusammen: die aminoterminal Domäne („*Cap*“, 1-214), die Kern- Domäne ("*Core*", 215-635), die Linker-Domäne (636-712) und die C-terminale Domäne (713-765) [Steward *et al.*, 1996; Redindo *et al.*, 1998] (Abb.20)

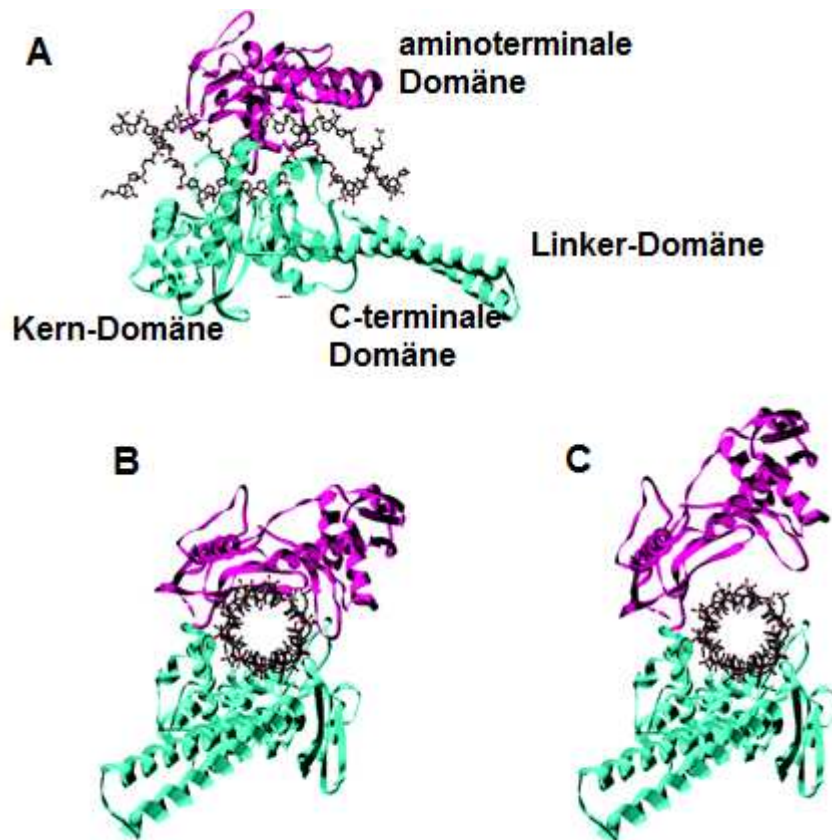


Abb.20: Struktur der Topoisomerase I

- A) Kristalline Struktur der humanen Topoisomerase I im Komplex mit 22 BP DNA  
 B) Blickwinkel der kristallinen Struktur von Topoisomerase I entlang der Achse der DNA Helix  
 C) Model der Klammeröffnung des Proteins

[modifiziert nach Carey *et al.*, 2003]

Die aminoterminal Domäne besteht aus 214 Aminosäuren und ist nicht essentiell für die katalytische Enzymaktivität. Jedoch spielt die N-terminale Domäne für die Zelle eine wichtige Rolle, da diese Domäne vier nukleare Lokalisationssequenzen besitzt, um mit anderen zellulären Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren oder p53 zu interagieren [Mo *et al.*, 2000; Pourquier und Pommier, 2001; Champoux, 2001]. Darauf folgt die hoch homologe Kern-Domäne, welche sich aus 421 Aminosäuren zusammensetzt, in drei Untereinheiten (Kern-Subdomäne I, II und III) eingeteilt wird und für die eigentliche DNA-Bindung verantwortlich ist [Champoux, 2001]. Eine konservierte, Protease-sensitive und aus 77 Aminosäuren bestehende Linker-Domäne verbindet die Kern-Domäne mit der C-terminalen Domäne. Möglicherweise kontrolliert die Linker-Domäne während der DNA-Relaxierung die Rotation des ungespaltenen Strangs [Stewart *et al.*, 1997; Pourquier und Pommier, 2001; Lisby *et al.*, 2001; Corbett und Berger, 2004]. Die C-terminale Domäne setzt sich aus 53

Aminosäuren zusammen. Die aktive Seite des Enzyms setzt sich aus einem fünfwertigen Element mit Arg-488, Lys-532, Arg-590, His-632 und Tyr-723 (Arg: Arginin; Lys: Lysin; His: Histidin; Tyr: Tyrosin) zusammen [Pommier *et al.*, 2010] Hier ist auch das katalytische Zentrum des Enzyms Tyr-723 lokalisiert, welches den katalytischen Zyklus startet [Champoux, 2001].

Der katalytische Zyklus der humanen Topoisomerase I kann in fünf Stufen unterteilt werden:

1. Im ersten Schritt bindet die Topoisomerase an die DNA. Wie alle Enzyme arbeitet auch die Topoisomerase nach dem "Schlüssel-Schloss-Prinzip", indem die Topoisomerase den DNA-Strang "umklammert" und eine positiv geladene Tasche für die DNA aus den Subdomänen I und II bildet. Die Subdomäne III und die C-terminale Domäne formen eine Basis, in die sich die DNA legt. Das "Schließen der Umklammerung" wird durch eine Interaktion von sechs Aminosäuren und einer Ionenbrücke begründet [Redindo *et al.*, 1998; Champoux, 2001; Carey *et al.*, 2003]. Durch diesen ersten Schritt wird die DNA für das anschließende Schneiden positioniert (Abb.21a).
2. Nun wird die DNA durch die Bindung des Tyr-723 an eine 3'-Phosphatgruppe und der damit verbundenen Bildung einer Phosphodiesterbrücke geschnitten. Der dabei entstandene Enzym-DNA-Komplex wird auch als "*Cleavage*" Komplex bezeichnet [Wang, 2002; Pommier, 1998] (Abb.21b).
3. Danach wird der komplementäre DNA-Strang durch den geschnittenen Einzelstrang hindurchgeführt. Bei dieser Rotation wird der geschnittene Strang gehalten und das freie Ende gedreht. Der Abbau der Torsionsspannung wird als mögliche Begründung für die Relaxierung der DNA gesehen (Abb.21c-d).
4. Im nächsten Schritt wird der DNA-Strang wieder verschlossen (Religation). Hier greift die freie 5'-Hydroxylgruppe des geschnittenen Strangs den Phosphotyrosinrest an (Abb.21e).
5. Im letzten Schritt öffnet sich das Enzym und setzt den DNA-Strang frei. Dadurch kann die Topoisomerase weitere katalytische Zyklen eingehen

[Steward *et al.*, 1998; Corbett und Berger, 2004; Champoux, 2001; Pommier *et al.*, 1998] (Abb.21f).

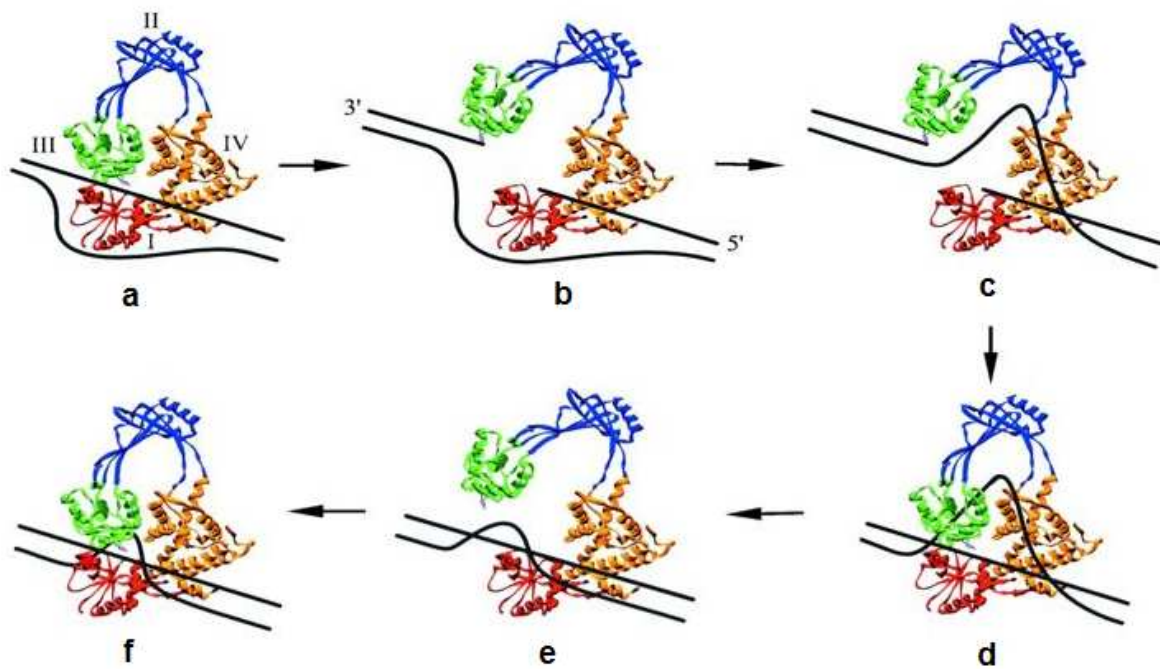


Abb.21: Der katalytische Zyklus der Topoisomerase I  
[modifiziert nach Kirkegaard *et al.*, 1978; [www.ch.ic.ac.uk](http://www.ch.ic.ac.uk)]

## 2.4.2 Topoisomerase II

Die humane Topoisomerase II gehört zur Gruppe vom Typ IIA. Im Gegensatz zu Topoisomerase I katalysieren Topoisomerase II eine Hindurchführung einer intakten DNA-Doppelhelix durch eine zweite Helix, die einen Doppelstrangbruch enthält. Topoisomerase II ist ein Heterodimer, welches  $Mg^{2+}$  als Cofaktor und ATP benötigt. Es gibt Hinweise, dass auch andere Metallionen als Cofaktoren fungieren können. In einer Studie von Gilroy und Austin konnte gezeigt werden, dass Magnesium-, Calcium- und Manganionen als Cofaktoren in humaner Topoisomerase II dienen können [Gilroy und Austin, 2011]. In einer Untersuchung von Deweese und Osheroff konnte gezeigt werden, dass neben Magnesium-, Calcium- und Manganionen auch Kobaltionen als Cofaktoren in Frage kommen [Deweese *et al.*, 2009; Deweese und Osheroff, 2010]. Topoisomerase II kann superspiralisierte DNA entwinden und DNA-Ringe katenieren oder dekatenerieren. Hierzu muss das Enzym beide Stränge eines Doppelstrangs schneiden, um durch die entstandene Lücke einen Doppelstrang hindurchführen zu können [Champoux, 2001; Wang, 2002].

In Säugetierzellen werden zwei Isoformen des Enzyms exprimiert, Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$ . Diese beiden Isoformen sind zu 70% sequenzhomolog, jedoch weisen sie auch einige Unterschiede auf. Topoisomerase II $\alpha$  hat ein Molekulargewicht von 170 kDa und wird von dem Gen 17q21-22 codiert. Topoisomerase II $\beta$  ist mit 180 kDa etwas schwerer und wird von dem Gen 3p24 codiert [Tan *et al.*, 1992]. Durch die Codierung der beiden Proteine durch verschiedene Gene werden sie auch unterschiedlich reguliert und während des Zellzyklus auch unterschiedlich exprimiert. So wird die Isoform II $\alpha$  während der S- und G<sub>2</sub> Phase vermehrt gebildet, der Gehalt steigt weiter während der G<sub>2</sub>/M-Phase und sinkt nach Ende der Mitose stark ab. Hingegen wird die Isoform II $\beta$  während des gesamten Zellzyklus konstant exprimiert [Larsen *et al.*, 1996; Isaacs *et al.*, 1998; Austin und Marsh, 1998].

Topoisomerase II-Enzyme können in drei Domänen eingeteilt werden (Abb.22). Die Unterteilung in die verschiedenen Domänen beruht auf den Aminosäuresequenzen der DNA-Gyrase aus *E. coli*, sie zählt zu den am besten untersuchtesten Typ IIA Topoisomerasen [Burden und Osheroff, 1998; Champoux, 2001]. Die aminoterminal Domäne ist mit der B-Untereinheit der DNA-Gyrase homolog. Die Domäne beinhaltet die Sequenzen für die ATP-Bindung und Hydrolyse. Die zentrale Untereinheit kann



mit der A-Untereinheit der DNA-Gyrase verglichen werden. Sie besitzt das Tyrosin (Tyr 805 und Tyr 821 in humaner Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$ ), welches die kovalente Bindung mit der DNA katalysiert [Deweese und Osheroff, 2010]. Die darauf folgende C-terminale Domäne ist von Spezies zu Spezies verschieden; sie enthält die nukleare Lokalisationssequenz sowie Stellen zur Phosphorylierung, welche für die Aktivierung oder Deaktivierung des Enzyms von Bedeutung sein können [Burden und Osheroff, 1998; Berger, 1998]. Die Topoisomerase II liegt als Phosphoprotein vor. Die Phosphorylierung der hauptsächlichen Serin-Reste wird durch den Zellzyklus reguliert. Wie bereits beschrieben liegt das Maximum der Expression in der G<sub>2</sub>/M-Phase.

Es lässt sich zusammenfassen, dass der aminoternale und die zentrale Domäne für die katalytische Aktivität eine wichtige Rolle spielen, hingegen die C-terminale Domäne für die Regulation und Funktionsfähigkeit wichtig ist.

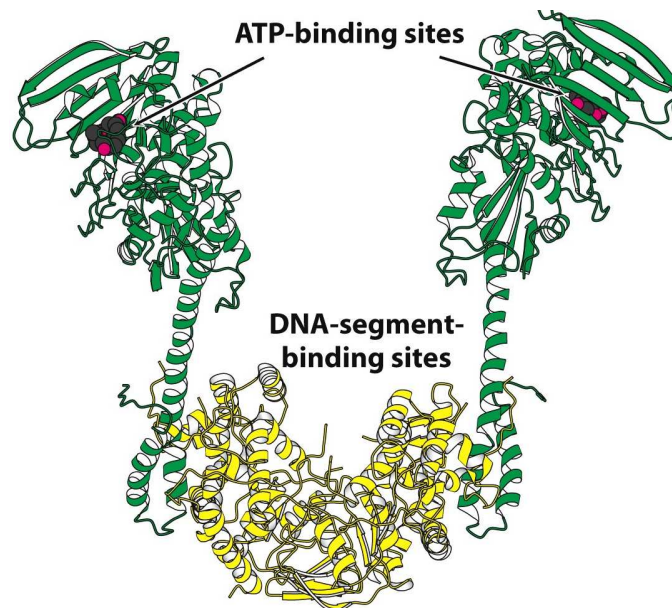


Abb.22: Struktur der Topoisomerase II  
[Berg *et al.*, 2007; <http://oregonstate.edu>]

Der katalytische Zyklus der humanen Topoisomerase II wird in nachfolgende sechs Stufen unterteilt und näher erklärt (Abb.23):

1. Bindung an die DNA: Im ersten Schritt bindet die Topoisomerase II an den zu schneidenden DNA-Strang (G-Segment); G-Segment leitet sich dabei von "gate" ab, da an diesem Strang die "Tür" geöffnet wird. Das Enzym erkennt anhand ihrer topologischen Struktur die Schnittstelle in der DNA (Abb.23b 1).
2. DNA-Topoisomerase-Komplex Bildung: Im zweiten Schritt erfolgt das Schneiden der DNA. Hierzu ändert die Topoisomerase II ihre Konformation, so dass die Tyrosin-Reste für den Angriff an die DNA positioniert werden. Das Enzym führt dann zwei koordinierte Einzelstrangbrüche ein, die um vier Basenpaare versetzt vorliegen. Während des Schneidevorgangs hält das Enzym seinen topologischen Zustand, indem es kovalent an das 5'-Ende der DNA über eine  $O^4$ -Phosphotyrosinbrücke bindet. Für diesen Vorgang ist die Anwesenheit eines zweiwertigen Metallkations notwendig (Abb.23b 2).
3. Hindurchführung des DNA-Strangs: Im nachfolgenden Schritt ändert sich die Konformation der Topoisomerase II durch die Bindung des Cofaktors ATP. Mit dieser strukturellen Änderung ist der Transport der intakten DNA-Helix (T-Segment) durch den im G-Segment gebildeten transienten Doppelstrangbruch möglich. T-Segment leitet sich von "transport" ab, da dieser Strang durch das "gate" hindurchgeführt wird. Durch diese ATP-induzierte topologische Änderung des Enzyms entsteht eine bewegliche Klammer ("*sliding clamp*") (Abb.23b 3).
4. DNA Ligation: In der vierten Stufe des Reaktionszyklus, nachdem der Transport des Doppelstrangs durch die Lücke erfolgt ist, unterliegt die Topoisomerase II einem Gleichgewicht zwischen Spaltung und Wiederverschluss mit der DNA (Abb.23b 4).
5. ATP-Hydrolyse: Im fünften Schritt hydrolysiert die Topoisomerase II ATP zu ADP und Orthophosphat; für diese Hydrolyse ist das divalente Metallion essentiell (Abb.23b 5).
6. Enzym Rückführung: Im letzten Schritt führt die Hydrolyse von ATP zur ursprünglichen strukturellen Form des Enzyms, dies bedeutet, dass sich die

"Klammer" öffnet, die DNA abdissoziiert und die Topoisomerase für einen erneuten katalytischen Zyklus bereit steht [Corbett und Osheroff, 1993; Burden und Osheroff, 1998; Berger, 1998; Champoux, 2001; Wilstermann und Osheroff, 2003; Corbett und Berger, 2004; Deweese und Osheroff, 2010] (Abb.23b 6).

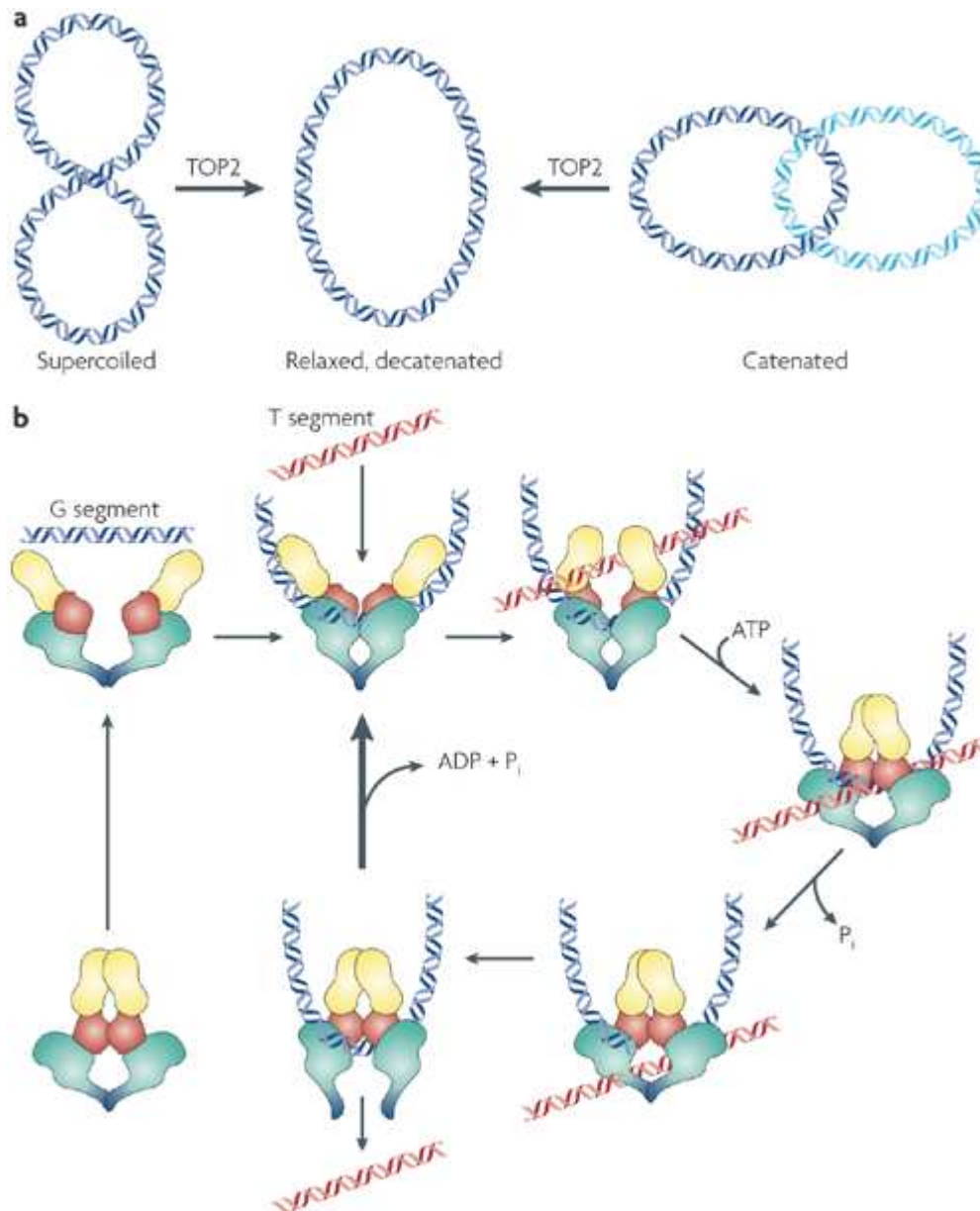


Abb.23: Der katalytische Mechanismus der Topoisomerase II  
[Nitiss, 2009; Schmitt, Osheroff und Berger, 2012]

Auf Grund dieses Mechanismus können Topoisomerasen II auch intramolekulare Knoten, wie sie bei katenierten DNA-Zirkeln vorkommen, entwinden bzw. dekatenerieren (Abb.23a).

### 2.4.3 Topoisomerasehemmstoffe

Alle Topoisomerasen besitzen die Fähigkeit DNA-Stränge zu schneiden, auch wenn sie verschiedene katalytische Zyklen und unterschiedliche zelluläre Funktionen aufweisen. Topoisomerasen sind essentiell für das Überleben der Zellen und regeln die DNA Topologie. Die Entwindung der DNA ist wichtig, da sie als Doppelhelix den Speicher aller genetischer Information enthält [Wang, 2002; McClendon und Osheroff, 2007; Deweese und Osheroff, 2009]. Auf Grund der wichtigen Rolle der Topoisomerasen in der Transkription und Replikation sind sie als Zielstruktur von großem wissenschaftlichem Interesse. Zahlreiche klinische Labors beschäftigen sich mit der Entwicklung und Testung verschiedener Medikamente zur Hemmung dieser Enzyme; insbesondere deren Verwendung als Chemotherapeutika gegen hämatologische und feste Tumore [Amin *et al.*, 2009; Castelli *et al.*, 2012; Pommier, 2013]. Topoisomerasehemmstoffe sind sehr selektiv, so beeinflussen Topoisomerase I Hemmstoffe nicht die Topoisomerase II und umgekehrt [Pommier, 2013]. Beispielsweise wirkt Camptothecin als Topoisomerase I Hemmstoff und Etoposid und Doxorubicin als Topoisomerase II Hemmstoff. Die potentiellen Hemmstoffe können mit dem Enzym an verschiedenen Stufen des katalytischen Zyklus der Topoisomerase interagieren; in Abbildung 22 wird dies beispielhaft an dem katalytischen Zyklus der Topoisomerase II gezeigt (Abb.24).

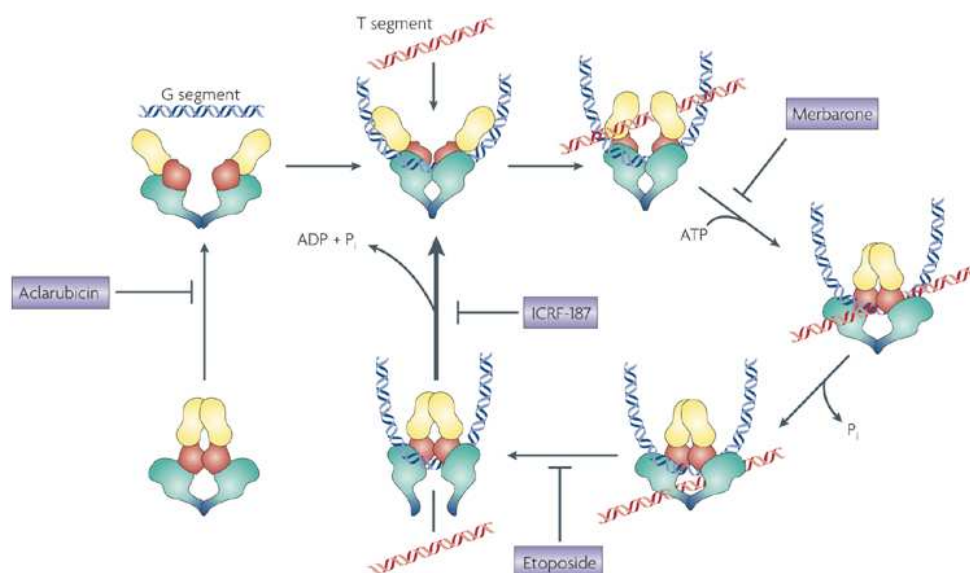


Abb.24: Beispiel der Inhibierung des katalytischen Zyklus der humanen Topoisomerase II durch Etoposid, Merbaron, ICRF-187 und Aclarubicin [Nitiss, 2009]

Die Hemmstoffe werden auf Grund ihres verschiedenen Wirkmechanismus unterschieden. Sie werden klassifiziert nach katalytischem Hemmstoff und klassischem Topoisomerasegift. Der katalytische Hemmstoff verhindert die DNA-Topoisomerase-Komplex Bildung, da das Enzym gehemmt wird, bevor es zur Interaktion mit der DNA kommt. Anders ist es bei der Giftung, hier bindet die Topoisomerase an die DNA und der Enzym/DNA-Komplex wird stabilisiert. Da sich der Komplex nicht von der DNA lösen kann, kommt es bei der Transkription zur Kollision mit der Replikationsgabel, welche dann zu DNA-Strangbrüchen führt (Abb.25).

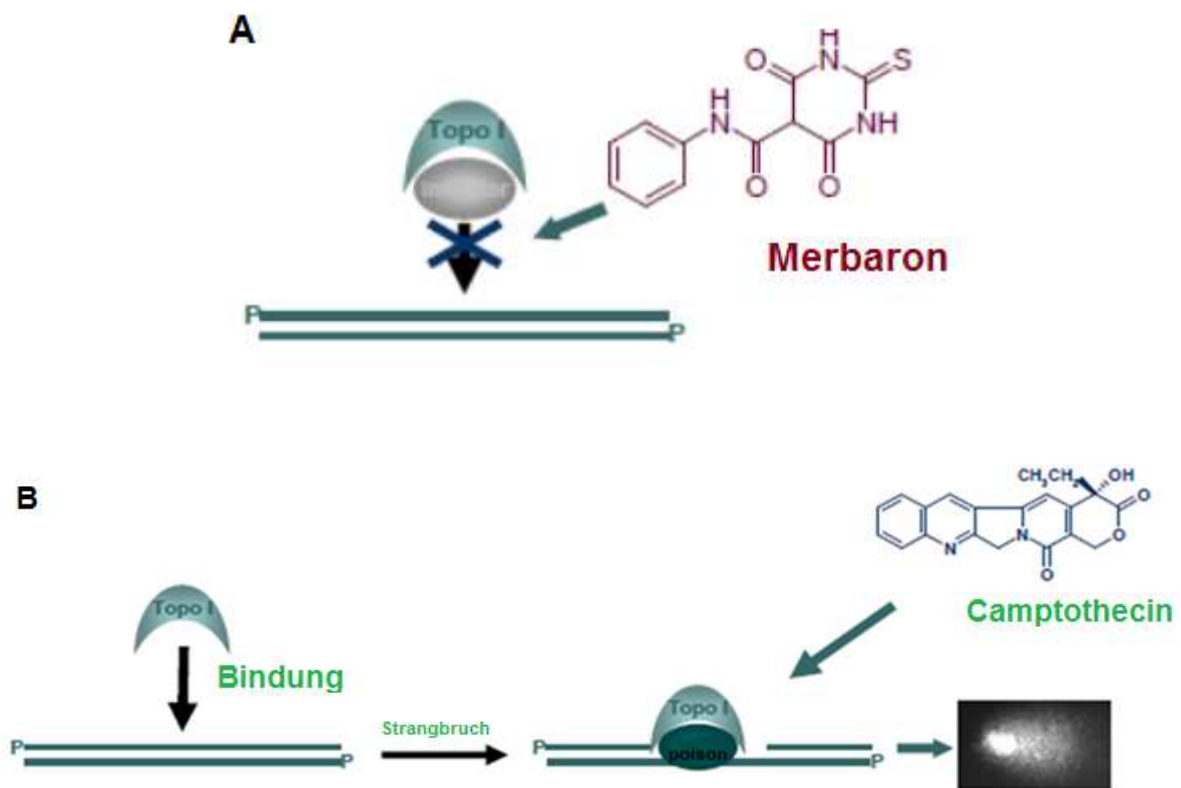


Abb.25: Katalytischer Topoisomerase-Inhibitor (A) versus Topoisomerase-Gift (B)  
 (A) Merbaron als katalytischer Inhibitor hemmt die Topoisomerase bevor es zur Komplexbildung mit der DNA kommt  
 (B) Camptothecin als Topoisomerase-Gift stabilisiert den Topoisomerase-DNA-Komplex, was zu DNA-Strangbrüchen führt

[in Anlehnung an Esselen *et al.*, 2009]

### 2.4.3.1 Topoisomerasegifte

Topoisomerasegifte können den Topoisomerase-DNA-Komplex, den sogenannten "*Cleavage*" Komplex im Zustand des DNA-Strangbruchs stabilisieren. Die eingeführten Strangbrüche, welche transient, kurzlebig und reversibel sind, sind notwendig für die katalytische Aktivität des Enzyms. Kommt es nun zu einer Stabilisierung oder zur Verlängerung der Halbwertszeit des Topoisomerase-DNA-Intermediats durch ein Topoisomerase-Gift, kann es beispielsweise zur Kollision mit der Replikationsapparatur oder Helicase kommen. So werden permanente DNA-Strangbrüche induziert, die, wenn sie nicht erkannt und repariert werden, zu mutagenen Ereignissen führen können [Corbett und Osheroff, 1993; Froehlich-Ammon und Osheroff, 1995; Burden und Osheroff, 1998; Larsen und Gobert, 1999; Errington *et al.*, 2004]. Es gibt hier zwei verschiedene Mechanismen der "Giftung": Zum einen gibt es Substanzen, die das Verschließen des Strangbruchs behindern (Religation) und zum anderen gibt es Substanzen, die die Bildung der Topoisomerase-DNA-Komplexe verstärken.

Für die Bildung dieser Topoisomerase-DNA-Komplexe gibt es drei mögliche Bildungswege. Beim ersten Weg interagiert die Substanz mit der DNA, das heißt die Substanz kann an Nukleinsäuren binden und es kommt zu einer Anreicherung der Topoisomerasegifte in der Umgebung der Enzyme. Eine zweite Möglichkeit ist die Interaktion zwischen Substanz und Enzym, bevor der DNA-Enzym-Komplex gebildet wird. Der dritte mögliche Bildungsweg beruht auf der Bindung des Topoisomerasegiftes spezifisch an den Enzym-DNA-Komplex [Froehlich-Ammon und Osheroff, 1995].

Nach neueren Untersuchungen agieren Topoisomerasegifte nach zwei deutlich verschiedenen Mechanismen und werden als "*interfacial*" oder "kovalente" (redoxabhängige) Gifte kategorisiert. "*Interfacial*" Topoisomerase-II-Gifte wirken in der Nähe der aktiven Tyrosin-Seite an der Protein-DNA-Verbindung. Sie formen nicht kovalente Bindungen mit Topoisomerase II und der DNA innerhalb des ternären Enzym-DNA-Gift-Komplexes. Zahlreiche "*interfacial*" Topoisomerase-II-Gifte interkalieren mit der DNA Doppelhelix an der zu teilenden Stelle und erhöhen den Level an "*Cleavage*" Komplexen durch Hemmung der Enzym-DNA-Ligation [Deweese und Osheroff, 2009; Bender *et al.*, 2008; Pommier und Marchand, 2011;

Timmel *et al.*, 2013]. Kovalente Topoisomerase-II-Gifte enthalten Protein-reaktive Gruppen, wie Chinone, Isothiocyanate oder Maleimide [Deweese und Osheroff, 2009; Bender *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2001; Lindsey *et al.*, 2005; Timmel *et al.*, 2013]. Diese Gruppe wird auch als "redox-abhängige Topoisomerase-II-Gifte" bezeichnet, da sie Redoxzyklisierung als Voraussetzung für die Aktivität induzieren können [Wang *et al.*, 2001; Lindsey *et al.*, 2004]. Im Gegensatz zu "*interfacial*" Giften binden kovalente Gifte an die Aminosäurereste außerhalb der aktiven Seite des Enzyms [Lin *et al.*, 2011; Bender *et al.*, 2007]. Daher kann die Giftwirkung von kovalenten Giften durch reduzierende Agenzien wie DTT (Dithiothreitol) oder  $\beta$ -Mercaptoethanol abgefangen werden [Wang *et al.*, 2001; Lindsey *et al.*, 2004; Lindsey *et al.*, 2005]. Der genaue Wirkmechanismus, wie kovalente Topoisomerase-II-Gifte die Enzymaktivität beeinflussen, ist noch ungeklärt. Die Giftung wird in Verbindung gebracht, mit der Fähigkeit das *N*-terminale "*gate*" des Proteins zu schließen [Bender *et al.*, 2007; Bender *et al.*, 2006; Bender und Osheroff, 2007; Timmel *et al.*, 2013].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Topoisomerasegifte, Camptothecin, Doxorubicin und Etoposid als Positivkontrollen verwendet, die in den nachfolgenden Abschnitten näher erläutert werden.



## Das Topoisomerase-I-Gift Camptothecin

Camptothecin ist ein natürliches Alkaloid, welches zuerst aus der Rinde des chinesischen Baumes *Camptotheca acuminata* extrahiert wurde [Wall *et al.*, 1966] (Abb.26). Schon damals war die antikanzerogene Wirkung der Substanz bekannt, jedoch erst 20 Jahre später wurde gezeigt, dass die Topoisomerase I das zelluläre Zielenzym für Camptothecin darstellt [Hsiang *et al.*, 1985]. Camptothecin bindet reversibel an den Topoisomerase I / DNA-Komplex und unterdrückt dadurch die Religation. Das Gift stabilisiert den "Cleavage" Komplex. Der aromatische Teil des Moleküls positioniert sich zwischen die DNA-Basenpaare und der aus der großen Furche der DNA herausragende Teil bindet mit der Topoisomerase I über Wasserstoffbrücken [Laco *et al.*, 2002; Pommier, 2004]. Während der S-Phase des Zellzyklus kommt es zur Kollision des Camptothecin stabilisierten Cleavage Komplexes mit der Replikationsgabel. So wird der transiente Einzelstrangbruch zum irreversiblen Doppelstrangbruch, welcher dann zum Zelltod führt [Holm *et al.*, 1989; Hsiang *et al.*, 1989; Pommier *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000; Sordet *et al.*, 2003]. Auch die Zytotoxizität von Camptothecin ist auf die Interaktion mit der Topoisomerase I zurückzuführen [Castelli *et al.*, 2012]. Es gibt vier eindeutige Hinweise, dass es sich bei Camptothecin um ein selektives Topoisomerase I Gift handelt:

1. das natürliche Camptothecin Isomer ist auch aktiv gegen Topoisomerase I [Jaxel *et al.*, 1989];
2. genetisch-modifizierte Hefe, welche keine Topoisomerase I exprimiert, ist resistent gegen die Wirkung von Camptothecin [Eng *et al.*, 1988; Nitiss und Wang, 1988];
3. ein weiterer Hinweis geben auch Camptothecin-resistente Zellen, welche eine Punktmutation im Top1 Gen aufweisen [Pommier *et al.*, 1999];
4. Camptothecin-produzierende Pflanzen, welche eine Punktmutation im Topoisomerase I Gen haben, sind immun gegen das Topoisomerase Gift [Sirikantaramas *et al.*, 2008].

Camptothecin bietet ein breites Spektrum an antitumoraler Aktivität, jedoch gibt es hier auch Grenzen; so die Tatsache, dass der  $\alpha$ -Hydroxylacton-E-Ring des Camptothecins leicht in eine Carboxylatform umgewandelt werden kann (Abb.24).

Diese Form ist inaktiv gegen Topoisomerase I und bindet an Serum Albumin [Mi *et al.*, 1994; Castelli *et al.*, 2012].

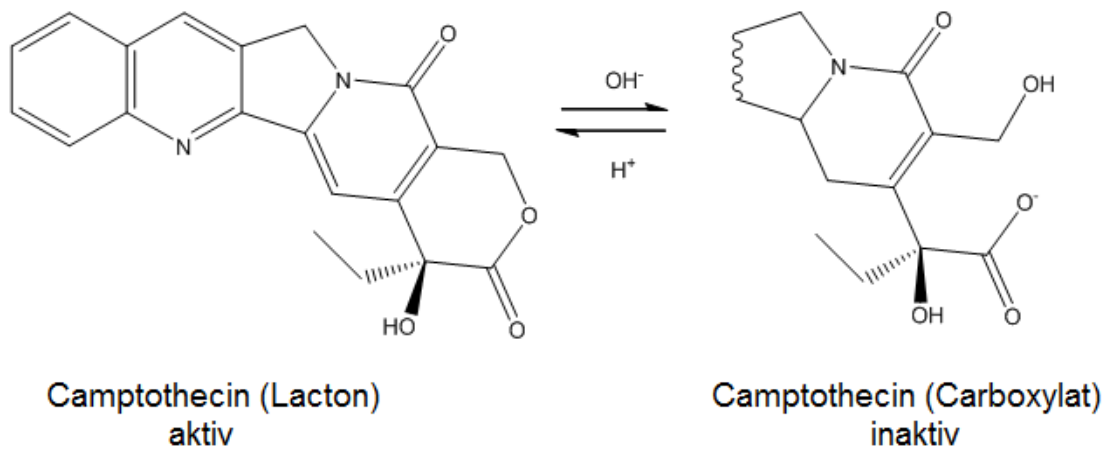


Abb.26: Die Lacton- und die Carboxylatform des Camptothecins

Auf Grund der Wasserunlöslichkeit und verschiedener adverser Effekte wird Camptothecin in der Klinik als Chemotherapeutikum nicht eingesetzt [Mross *et al.*, 2004; Moertel *et al.*, 1972; Muggia *et al.*, 1972]. Jedoch werden derzeit zwei wasserlösliche Camptothecin Derivate klinisch verwendet; zum einen Topotecan, auch bekannt unter dem Handelsnamen Hycamtin<sup>®</sup>, und Irinotecan (Camptosar<sup>®</sup>). Topotecan wird zur Behandlung von Ovarialkarzinomen und kleinzelligen Lungenkarzinomen eingesetzt, während Irinotecan zur Behandlung von Kolonkrebs verwendet wird [Tomicic und Kaina, 2013]. Alle Camptothecin-Derivate fungieren als unkompetitive Inhibitoren, die den gleichen Wirkmechanismus wie Camptothecin selbst aufweisen.

## Topoisomerase-II-Gifte

### Doxorubicin

Doxorubicin ist ein Topoisomerase-II-Gift, welches zur Gruppe der Anthracyclinen zählt (Abb.27A). Die Aglykone der Anthracycline bestehen aus einem tetrazyklischen Ringsystem, welches ein Anthrachinon-Chromophor und ein Aminoglykosid besitzt [Cutts *et al.*, 2005; Minotti *et al.*, 2004].

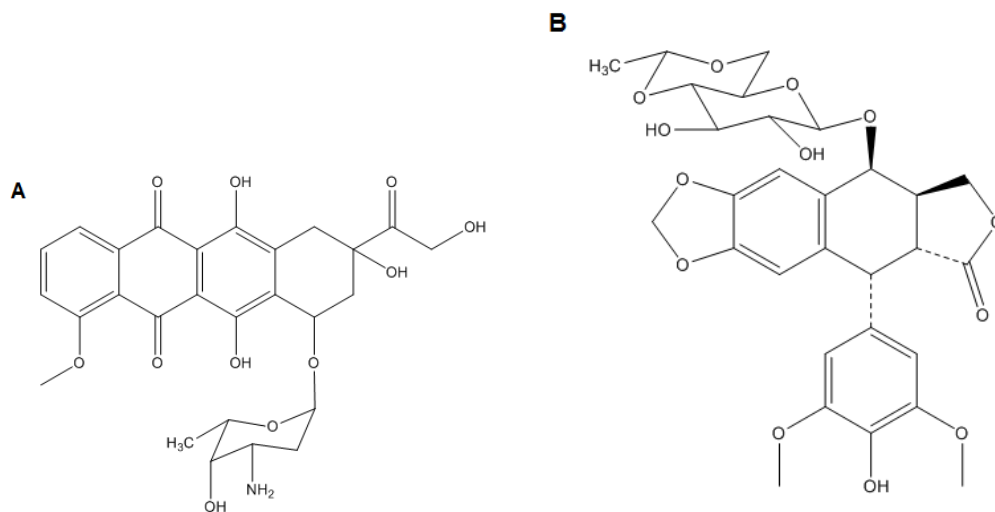


Abb.27: A) Strukturformel von Doxorubicin  
B) Strukturformel von Etoposid

Doxorubicin hemmt die Topoisomerase II durch die Stabilisierung des Topoisomerase-DNA-Intermediats. Auch verschiedene Derivate werden als Chemotherapeutika klinisch verwendet, jedoch ist die einsetzbare Dosis auf Grund der Kardiotoxizität stark eingeschränkt [Cutts *et al.*, 2005; Minotti *et al.*, 2004].

Doxorubicin wirkt ebenso wie das Topoisomerase I Gift Camptothecin zytotoxisch; jedoch ist die Wirkung des Doxorubicins nicht alleine auf die Stabilisierung des "Cleavage" Komplexes zurückzuführen. So kann Doxorubicin Helicasen modifizieren, so dass keine Strangseparation erfolgen kann. Eine weitere Wirkweise ist die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Zwei-Elektronenübertragung, die zur Interaktion und Beeinträchtigung von Makromolekülen (DNA, Proteine, etc.) und Lipidmembranen führt [Hande, 1998]. Weiter kann Doxorubicin auf Grund des planaren Ringsystems mit der DNA interkalieren. Dies erklärt, warum Doxorubicin in niedrigen Konzentrationen

Topoisomerase II "*Cleavage*" Komplexe giftet, aber in hohen Konzentrationen die Komplexbildung unterdrückt [Pommier *et al.*, 2010].

## **Etoposid**

Etoposid zählt zur Gruppe der Podophyllotoxine, welche erstmals aus der Wurzel der Pflanze *Podophyllum peltatum* isoliert wurde (Abb.27B). Etoposid und ein weiteres Derivat Teniposid wurden als die Verbindungen mit der höchsten antineoplastischen Aktivität identifiziert, welche häufig gegen myeloische Leukämie, Lungen-, Brust- und Ovarialkarzinome eingesetzt werden. Diese Gifte beeinflussten jedoch nicht wie die anderen Podophyllotoxine den Spindelapparat. Podophyllotoxine besitzen antimitotische Eigenschaften, die auf der Polymerisation des Tubulins beruhen [Hande, 1998; Gordaliza *et al.*, 2000; Baldwin und Osheroff, 2005]. Hingegen stabilisiert Etoposid den Topoisomerase-II/DNA-Komplex, indem es die Religation verhindert. Es wird vermutet, dass Etoposid zuerst an das Enzym bindet [Burden *et al.*, 1996; Baldwin und Osheroff, 2005].

### 2.4.3.2 Katalytische Topoisomerase-Inhibitoren

Neben den klassischen Topoisomerasegiften gibt es auch sogenannte katalytische Topoisomerasehemmstoffe. Diese Gruppe stabilisiert nicht wie die Gifte den kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplex im Zustand des DNA-Strangbruchs, sondern sie agieren auf verschiedene Arten mit den Zielenzymen. Die katalytischen Hemmstoffe sind eine heterogene Gruppe (Abb.28). Zunächst standen die antimikrobiellen Substanzen Novobiocin und Coumermycin in wissenschaftlichem Interesse, welche die ATP-Bindung bei der Topoisomerase II und der DNA-Gyrase hemmen [Boege, 1996; Bailly, 2000; Larsen *et al.*, 2003]. Aclarubicin und Suramin verhindern die Bindung des Enzyms an die DNA [Boege, 1996; Larsen *et al.*, 2003]. Merbaron und  $\beta$ -Lapachone verhindern die Einführung des DNA-Strangbruchs [Boege, 1996; Larsen *et al.*, 2003; Fortune *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1993]. Ein ähnlicher Wirkmechanismus wird auch für Isodiospyrin postuliert, welches aus *Diospyros maritima* isoliert wurde und strukturell aus einem asymmetrischen 1,2-Binaphthoquinon Chromophor besteht [Kuo *et al.*, 1997]. Auch wurde von Flavonol Glykosiden isoliert aus *Vicia faba* und *Lotus edulis* berichtet, welche katalytische Hemmeffekte auf Topoisomerase I aufweisen sollen [Tselepi *et al.*, 2011]. Einige Triterpene fungieren ebenso als katalytische Hemmstoffe, in dem sie mit der DNA um die Bindung an der Topoisomerase konkurrieren [Syrovets *et al.*, 2000]. Ebenso sind Fettsäuren wie die konjugierte Eicosapentaensäure (cEPA) als katalytische Hemmstoffe bekannt. cEPA kommt in Seegrass der grünen und roten Alge vor und verhindert die superspiralisierte DNA mit Hilfe der Topoisomerase I zu relaxieren [Yonezawa *et al.*, 2005; Yonezawa *et al.*, 2007]. Die Fettsäure unterdrückt dabei die "Cleavage" Reaktion und stabilisiert nicht dem Topoisomerase-DNA-Komplex [Castelli *et al.*, 2009].

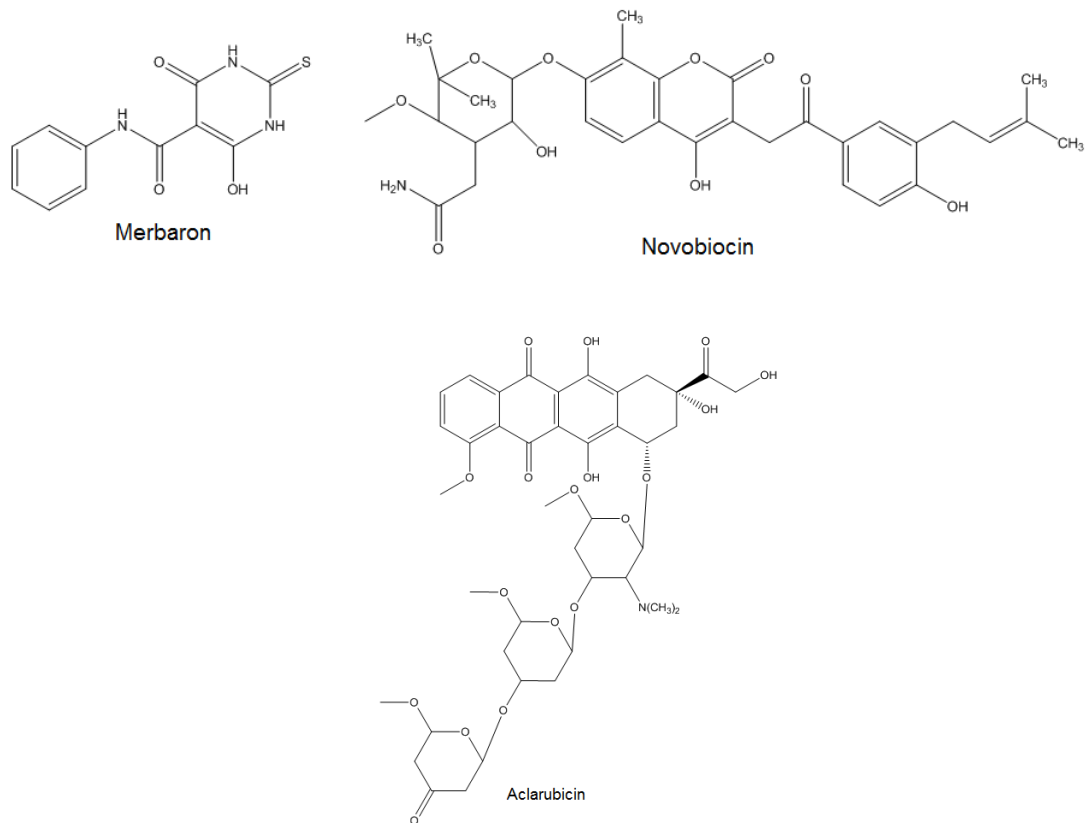


Abb.28: Beispiele für katalytische Topoisomerase-Hemmstoffe

Katalytische Hemmstoffe finden nicht nur wegen ihrer antineoplastischen Eigenschaften, sondern auch wegen kardioprotektiven Eigenschaften klinische Verwendung. Die Substanzen können auch als Adjuvantien eingesetzt werden, um die Effizienz (z.B. von Chemotherapeutika) zu steigern und so zu verbessern [Larsen *et al.*, 2003].

## **2.5 Histondeacetylase (HDAC)**

Die Tumorgenese insbesondere des Gastrointestinaltrakts scheint von der genetischen Veranlagung, Umweltfaktoren und der Ernährung abhängig zu sein [Rafter *et al.*, 2004]. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Faktoren direkt epigenetische Mechanismen beeinflussen, welche mit der Entstehung von Tumoren im Zusammenhang stehen. Wichtige epigenetische Mechanismen stellen die DNA-Methylierung, Histonmodifikation und non-coding RNA dar [Link *et al.*, 2010]. Zahlreiche posttranslationale Histon-Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Ubiquitylierung, SUMOylierung, Glycosylierung sind bisher beschrieben. Die Protein Acetylierung/Deacetylierung spielt eine große Rolle in der Regulation der Gentranskription, der Chromatinstruktur, Nukleosomales Remodeling, Proteinenzym-Aktivität und in der epigenetischen Regulation der Genexpression [Adock *et al.*, 2007; Gallinari *et al.*, 2007; Glozak *et al.*, 2005; Marks *et al.*, 2001]. Die Acetylierung/Deacetylierung ist ein reversibler zellulärer Prozess, der von zwei Enzymfamilien, der Histonacetyltransferase-Familie (HAT) und der Histondeacetylase-Familie (HDAC), katalysiert wird [Shilatifard, 2006; Li Sui *et al.*, 2012] (Abb.29). Die Modulation der Histonstruktur über Acetylierung und Deacetylierung zählt zu den wichtigsten posttranslationalen Proteinmodifikationen [Marks *et al.*, 2004].

HDACs gehören zur Gruppe von zinkabhängigen Metalloenzymen, welche die Abspaltung von Acetylresten von Histonenden katalysieren. Es sind ubiquitäre Enzyme, welche in Pflanzen, Tieren, Pilzen sowie Archaeabakterien vorkommen. Bis heute sind 18 humane HDACs identifiziert, welche sich in vier Klassen unterteilen (Tab.3). Klasse I HDACs sind homolog zum Hefeprotein Rpd3 und sind hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, darunter zählen HDAC 1, 2, 3 und 8. HDAC1 und HDAC2 sind ausschließlich nur im Zellkern zu finden, da sie kein nukleares Export Signal besitzen [de Ruitjer *et al.*, 2003]. HDACs der Klasse II sind homolog zu dem Hefeprotein Hda1 und translozieren zwischen Zellkern und dem Zytoplasma. Zur Klasse II gehören HDAC 4, 5, 7 und 9 sowie HDAC 6 und 10. Klasse III HDACs werden durch Sirtuin repräsentiert, eine Gruppe von sieben HDACs, die dem Hefeprotein Sir2 ("*silent information regulator*") ähneln und NAD abhängig sind. Klasse IV HDAC 11 ist sowohl der Klasse I als auch der Klasse II homolog [Gao *et al.*, 2002; Gregoretti *et al.*, 2004; Verdone *et al.*, 2006; Rajendran *et al.*, 2011; Thakur

*et al.*, 2012]. HDACs befinden sich zur Deacetylierung in sogenannten Multienzymkomplexen. Durch diese Multiproteinkomplexe werden die HDACs zur Promoterregion rekrutiert und können dann fungieren [De Ruijter *et al.*, 2003; Biel *et al.*, 2005].

Tab.3: HDAC Klassen

Klassen	I	II	III	IV
HDAC	1, 2, 3 und 8	4, 5, 6, 7, 9 und 10	12, 13, 14, 15, 16, 17 und 18	11
Homologie	Rpd3	Hda1	Sir2	Klasse I und II
Lokalisation	Zellkern	Zellkern und Zytoplasma		

Nukleosome sind Untereinheiten des Chromatins und komprimieren die DNA und Histonproteine so, dass sich 146 Basenpaare der DNA zweimal um ein Oktamer der Histonproteine (H2A, H2B, H3 und H4) winden. Histon-Acetylierung und -Deacetylierung regulieren die Gentranskription, indem dadurch die die Packung der DNA bzw. der Nukleosom-Polymere verändert werden [Gallinari *et al.*, 2007; Sengupta und Seto, 2004]. Deacetylierung bedeutet, dass HDACs die negativ geladenen Acetylgruppen von Histonen am *N*-terminalen Enden abspalten und auf Coenzym A übertragen, was zu einer dichteren Packung der DNA um die Histone führt. Durch die Abspaltung der Acetylgruppe, wird Lysin in den Histonen wieder positiv und die negativ geladene DNA wird angezogen. Die DNA windet sich stärker um die Histone und steht in diesem Zustand nicht für die Transkription zur Verfügung (Heterochromatin).

Die HATs wirken entgegengesetzt; durch diese Enzyme werden Acetylgruppen von Coenzym A auf *N*-terminales Lysin der Histone übertragen. Hierdurch erhalten die Histone eine negative Ladung und die gleichwertig geladene DNA wird abgestoßen, wodurch die DNA für Transkriptionsfaktoren und Reparaturmechanismen zugänglich wird (Euchromatin) (Abb.29) [Jenuwein *et al.*, 2001; De Ruijter *et al.*, 2003; Verdone *et al.*, 2006; Ducasse *et al.*, 2006]. Bedeutende Lysinreste für Acetylierungs- und



Deacetylierungsprozesse sind H3K9, H3K14, H4K5, H4K8, H4K12 und H4K16 (H: Histon; K: Lysin).

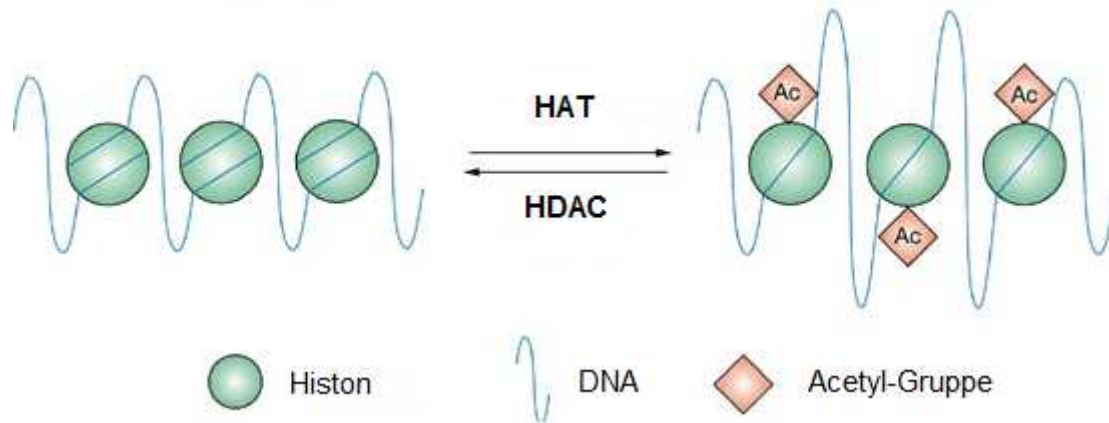


Abb.29: Zusammenspiel von Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen  
 HAT: Histonacetyltransferasen; HDAC: Histondeacetylase  
 [in Anlehnung an Jenuwein *et al.*, 2001]

HDACs sind an einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt, die für die Genomstabilität von großer Bedeutung sind; dazu gehören die Transkription, der Zellzyklusverlauf, Zelldifferenzierung; DNA-Replikation und die Kontrolle von DNA-Schäden und Reparaturmechanismen sowie die Regulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [Marks *et al.*, 2004; Dokmanovic *et al.*, 2007; Eot-Houllier *et al.*, 2009; Lahue *et al.*, 2012]. HATs und HDACs stehen unter physiologischen Bedingungen in der Zelle im Gleichgewicht und regulieren so Proliferation, Apoptose und Differenzierung. Ein Ungleichgewicht dieser Enzyme z.B. durch Aktivitätshemmung oder Überexpression kann zur genomischen Instabilität über verschiedene Mechanismen, wie die Fehlregulation des Zellzyklus oder DNA-Reparaturmechanismen, führen. Die Beeinflussung der Enzyme kann sowohl auf der Expressionsebene stattfinden als auch die Aktivität betreffen [Eot-Houllier *et al.*, 2009; Rajendran *et al.*, 2011]. Die biologische Aktivität der HDACs kann in zwei Bereiche unterteilt werden, zum einen in die enzymatische Aktivität (die Fähigkeit Histone und nicht-Histon Proteine zu deacetylieren) und zum anderen in die funktionale Aktivität (z.B. die Befähigung die Transkription zu regulieren) [Sengupta und Seto, 2004]. Verschiedene Tumore überexprimieren HDACs, hingegen werden HDAC-Hemmstoffe als Medikamente in der Therapie gegen Alzheimer, Parkinson und Krebs eingesetzt [Jung, 2001; Moradei *et al.*, 2005; Verdone *et al.*, 2006; Abel *et*

*al.*, 2008; Weichert *et al.*, 2008; Hahnen *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2009]. Über einige Lebensmittelinhaltsstoffe wurde bereits berichtet, dass diese die HDAC-Aktivität in Tumorzellen beeinflussen [Rajendran *et al.*, 2011] (Kap.2.6). Hier ist jedoch die Zweiwertigkeit der Lebensmittelinhaltsstoffe im Hinblick auf die Beeinflussung der HDAC zu beachten. So kann eine Beeinflussung der HDAC-Aktivität und/oder Expression in Tumorzellen präventiv wirken, während in normalen Zellen eine Veränderung des Histoncodes zur genomischen Instabilität und zur herunterregulierten DNA-Reparatur führen kann [Bhalla, 2005].

Desweiteren wurde berichtet, dass HATs und HDACs auch nicht-Histon Proteine acetylieren bzw. deacetylieren und somit ihre Enzymaktivität, ihre Stabilität und das DNA Bindungsvermögen regulieren. Zu diesen nicht-Histon Proteinen zählen Transkriptionsfaktoren wie p53, Smad7 und NF $\kappa$ B, andere Zellproteine wie  $\alpha$ -Tubulin und HSp90 [Glozak *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2001; Greene und Chen, 2004; Gu und Roeder, 1997; Gronroos *et al.*, 2002; Bali *et al.*, 2005; Hubbert *et al.*, 2002; Kovacs *et al.*, 2005; L'Hernault und Rosenbaum, 1985; Mu *et al.*, 2004; Arif *et al.*, 2007; Qui *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2004]. Es wurde berichtet, dass ein Anstieg der HDAC2 Expression mit einem Verlust des APC ("*Adenomatous-polypsis-coli*") Tumorsuppressorgens einhergeht und damit gegen proapoptotische Signale in Kolonkrebszellen wirkt [Zhu *et al.*, 2004]. HDAC 3 scheint einen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus zu haben [Li *et al.*, 2006]. Klasse II HDACs regulieren Transkriptionsfaktoren wie MEF und Runx, kontrollieren die Differenzierung und zelluläre Hypertrophie in Muskelgewebe [Zhang *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2007; Vega *et al.*, 2004]. Die Acetylierung schützt Proteine vor der Ubiquitinylierung und damit folglich vor dem Proteasom-vermittelten Abbau, da Lysin-Reste sowohl Zielstrukturen für die Acetylierung als auch für die Ubiquitinylierung darstellen. Die Modulation der p53 Stabilität durch Acetylierung und Deacetylierung zeigt eine mögliche Relation zwischen Acetylierung und Ubiquitinylierung. So rekrutiert E3 Ligase Mdm3 HDAC1 zu p53 und das deacetylierte p53 wird dadurch eher ubiquitinyliert und damit degeneriert [Ito *et al.*, 2002]. p53 hat insgesamt sieben mögliche Acetylierungs-Stellen an Lysin-Resten. Es wurde berichtet, dass verschiedene Arten von DNA-Schäden mit der Acetylierung von p53 zusammenhängen [Glozak und Seto, 2007]. UV-induzierte DNA-Schäden haben eine Acetylierung (HAT $\uparrow$ ; HDAC $\downarrow$ ) von Lys 320 und 373 des p53 zur Folge; dies wiederum führt zur Aktivierung von p21, was zu einem Zellzyklusarrest führt [Liu *et al.*, 1999].

Auch wurde von einer Acetylierung von Lys 373 berichtet, welche die Interaktion von p53 mit den Histondeacetylasen HDAC1 und SIRT1 stabilisiert [Knights *et al.*, 2006].

## 2.5.1 HDAC-Hemmstoffe

In vielen Krebszellen ist die HDAC Expression erhöht, was zu einer verstärkten Deacetylierung von Histonen sowie nicht-Histon Proteinen führt. Die Entwicklung spezifischer HDAC-Hemmstoffe gilt als wichtiges therapeutisches Ziel zur Behandlung von Tumoren. HDAC-Inhibitoren beeinflussen den Zellzyklus, Apoptose, verschiedene Protein-Acetylierung und die Differenzierung von transformierten Zellen. Zahlreiche HDAC-Inhibitoren hemmen die HDAC-Aktivität, jedoch beeinflussen nicht oder nur marginal die HDAC Expression. Die katalytische Domäne von HDACs beinhaltet über 390 Aminosäuren und das aktive Zentrum hat die Form einer tubulären Tasche [Finnin *et al.*, 1999]. Die Acetylgruppe des Lysinrestes des Substratproteins wird durch das Angriffssystem der HDACs entfernt. Wie bereits erwähnt, sind HDAC zinkabhängige Metalloenzyme; dieses Zink-Ion ist eine unabdingbare Komponente dieses Angriffssystems. Daher beruht die Wirkung vieler HDAC-Inhibitoren auf der Entfernung des Zink-Ions im HDAC Zentrum [Finnin *et al.*, 1999; Buggy *et al.*, 2000; Vanommeslaeghe *et al.*, 2003].

HDAC-Inhibitoren können in fünf Kategorien eingeteilt werden: Hydroxyamsäuren-Derivate wie TA (Trichostatin A) und Vorinostat, kurzkettige Fettsäuren wie Buttersäure und Valproinsäure, elektrophile Ketone wie Trifluoromethyl-Ketone, Aminobenzamide wie MS-275, CI-994 und MGC0103 und natürliche zyklische Peptide wie Romidepsin und Apicidin (Tab.4) [Jeong, 2008].

Tab.4: Einteilung der HDAC-Inhibitoren

Substanzklasse	Beispiele	Allgemeine Information	Literatur
Hydroxyamsäure-Derivate	Trichostatin A (TA)	Wirkung im nanomolaren Bereich <i>in vitro</i>	Yoshida <i>et al.</i> , 1990
	Vorinostat	Wirkung in nanomolaren Bereich; zu klinischen Studien zugelassen	Mann <i>et al.</i> , 2007; Olsen <i>et al.</i> , 2007
Kurzkettenige Fettsäuren	Buttersäure	Wirkung im millimolaren Bereich	Waldecker <i>et al.</i> , 2008 ; Gallinari <i>et al.</i> , 2007; Leder und Leder, 1975; Riggs <i>et al.</i> , 1977
	Valproinsäure	Medikament gegen Epilepsie; nun klinische Studien zur Behandlung von Krebs	Atmaca <i>et al.</i> , 2007; Chavez-Blanco <i>et al.</i> , 2005; Kuendgen <i>et al.</i> , 2006
Elektrophile Ketone	Trifluoromethyl-Ketone	Vergleich zu anderen HDAC-Inhibitoren verlängerte Halbwertszeit	Frey <i>et al.</i> , 2002
Aminobenzamide	MS-275 CI-994 MGC0103		Jeong, 2008
Natürliche zyklische Peptide	Romidepsin Apicidin		Jeong, 2008

In dieser Arbeit wurde TA als Positivkontrolle mitgeführt. Aus diesem Grund wird im Folgenden auf diese Substanz genauer eingegangen. TA ist ein bakterielles Gärprodukt der *Streptomyces* Spezies und wurde ursprünglich als Fungizid eingesetzt. TA wirkt bereits im nanomolaren Bereich als HDAC-Inhibitor *in vitro* und wird häufig in der Erforschung der Proteinacetylierung eingesetzt. Es verursacht eine Akkumulation von acetylierten Histonmolekülen in Säugetierzellen [Yoshida *et al.*, 1990]. TA hemmt selektiv die Klasse I und II HDACs (Abb. 30) [Vanhaecke *et al.*, 2004]. Es wurde gezeigt, dass TA Zellen in der G<sub>1</sub>- und der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus arretiert und Differenzierung induziert [Yoshida *et al.*, 1995]. Weiter wurde in einer

Studie von Vigushin *et al.* eine potente Wirkung von TA gegen Brustkrebs in Ratten festgestellt [Vigushin et al., 2001].

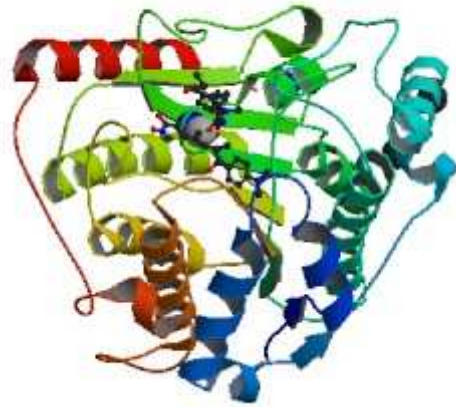


Abb.30: Struktur von HDAC 8 mit Trichostatin A  
[[www.pdb.org](http://www.pdb.org)]

## 2.5.2 Posttranslationale HDAC-Modifikation

Es gibt eine Reihe von posttranslationalen HDAC-Modifikation, wie Phosphorylierung, Ubiquitinylierung, Acetylierung etc. Im Folgenden wird die in dieser Arbeit relevante SUMOylierung näher betrachtet.

### 2.5.2.1 SUMO

Im Jahr 1996 wurde erstmals das SUMO-Protein ("*small ubiquitin-like modifier*") in Säugern identifiziert [Matunis *et al.*, 1996] (Abb.32). SUMO-Proteine gehören zur Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine, die analog zu Ubiquitin über kovalente Bindungen mit zellulären Proteinen verknüpft werden. In Wirbeltieren wurden bislang vier verschiedene Mitglieder der SUMO-Proteinfamilie identifiziert: SUMO- 1, SUMSO-2 und SUMO-3 und SUMO-4 [Sarge und Park-Sarge, 2009]. SUMO-1 ist aus 101 Aminosäuren zusammengesetzt und ist zu 18% homolog zu Ubiquitin. SUMO-1 ist zu 50% homolog zu SUMO-2 und -3, die untereinander fast identisch sind.

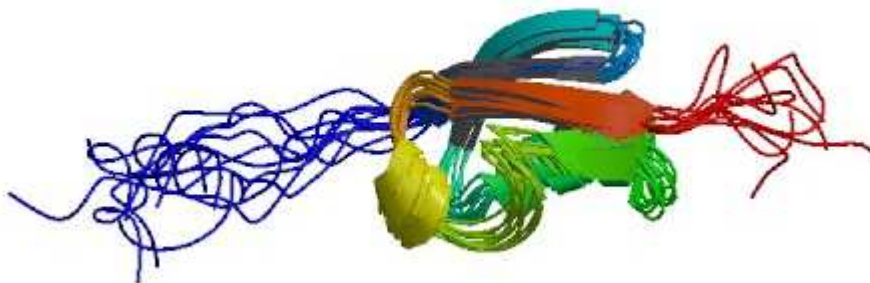


Abb.32: Struktur von SUMO 1  
[www.pdb.org; Bayer *et al.*, 1998]

Beim Vorgang der SUMOylierung bindet SUMO an Proteine. Neben der stark erforschten Ubiquitinylierung stellt die SUMOylierung eine besondere Art der posttranslationalen Modifikation dar. Dies ist ein reversibler Prozess, der beispielsweise die Genexpression, intrazellulärer Transport, Lokalisation oder die Aktivität und Stabilität von Proteinen steuert [Geoffroy und Hay, 2009]. Der Mechanismus der SUMOylierung erfolgt durch die Ausbildung einer kovalenten

Isopeptidbindung zwischen der C-terminalen Carboxylgruppe eines Glycinrestes von SUMO und der  $\epsilon$ -Aminogruppe einer Lysinseitenkette im Zielprotein. Diese Konjugationsreaktion wird durch eine enzymatische Kaskade aus SUMO-aktivierendem Enzym (SAE), SUMO-konjugierendem Enzym (E2) und der Proteinligase (E3) katalysiert. Alle SUMO-Proteine werden als Vorläuferproteine synthetisiert, die direkt hinter einem homologen Gly-Gly-Motiv C-terminal prozessiert werden. Der Prozess wird initiiert durch SAE, ein Heterodimer aus SAE1 und SAE2. Dieses Heterodimer katalysiert die Bildung von adenyliertem SUMO, wobei das C-terminale Ende der Carboxygruppe von SUMO kovalent an Adenosinmonophosphat (AMP, Adenosinmonophosphat) bindet. Bei Spaltung dieser Bindung wird ein Thioester zwischen dem C-terminalen Glycinrest des SUMO-Proteins und SAE2 ausgebildet. Im weiteren Schritt wird SUMO katalytisch auf das Cystein 93 in SAE2 übertragen. Danach wird SUMO auf das E2-Enzym Ubc9 unter Bildung eines Thioesters transferiert. Schließlich vermittelt Ubc9 den Transfer von SUMO bzw. dessen C-terminalen Glycinrestes auf ein Lysin im Zielprotein. Mit Hilfe der Ligase E3 wird SUMO an das Protein gebunden. Die DeSUMOylierung des Zielproteins und damit das Ende des Zyklus erfolgt mit Hilfe von SUMO-spezifischen Proteasen (SENPs), die zur Dekonjugation des Substrates führen (Abb.33) [Hay, 2005; Sarge und Park-Sarge, 2009].



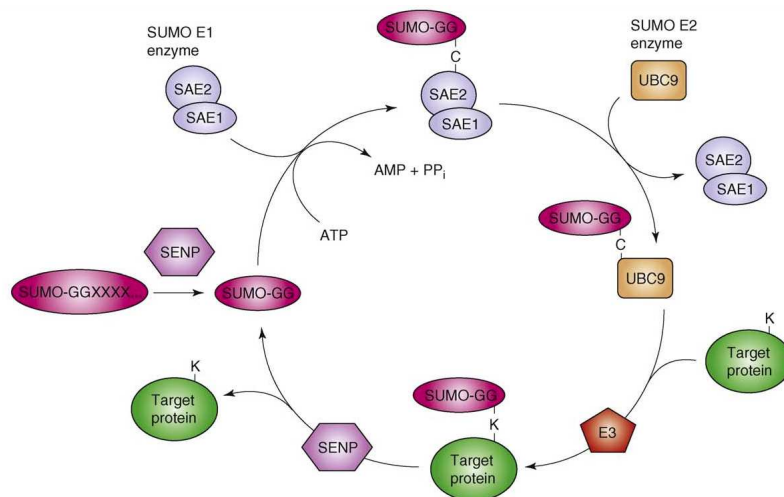


Abb.33: Enzymatische Kaskade der SUMOylierung

Alle Sumo-Proteine werden als Vorläuferproteine synthetisiert, die direkt hinter einem homologen Gly-Gly-Motiv C-terminal prozessiert werden. Das reife SUMO-Protein wird dann durch das E1-Heterodimer SAE1-SAE2 aktiviert, wodurch ein Thioester zwischen dem C-terminalen Glycinrest des Sumo-Proteins und SAE2 ausgebildet wird. SUMO wird dann auf den katalytisch aktiven Cysteinrest von SAE2 übertragen. Im nächsten Schritt wird SUMO auf das E2-Enzym Ubc9 unter erneuter Bildung eines Thioesters transferiert. Schließlich vermittelt Ubc9 den Transfer von Sumo bzw. dessen C-terminalen Glycinrestes auf ein Lysin im Zielprotein. In den meisten Fällen ist dieser Schritt durch die E3-Ligase vermittelt. Abschließend wird der Zyklus durch DeSUMOylierung des Zielproteins mittels SUMO spezifischer Proteasen (SENP) abgeschlossen.

[in Anlehnung an Hay und Geoffroy, 2009; Sarge und Park-Sarge, 2009]

Das Ubiquitin-ähnliche SUMO-System kontrolliert eine Reihe von Proteinen, die mit zellulären Schlüsselfunktionen assoziiert werden. So kann es durch die Änderung der Genexpression auch die Signalwege für Zellwachstum, Proliferation, Apoptose und DNA-Reparatur beeinflussen. In den letzten Jahren sind über hundert SUMO-Substratproteine charakterisiert worden [Geoffroy und Hay, 2009]. So wurden in Säugerzellen Topoisomerasen oder Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, cAMP-"*responsives Element*", (CRE)-Bindeprotein (CREB), das Proto-Onkogenprodukt c-Jun sowie das Tumorsuppressorprotein p53 durch SUMOylierung modifiziert [Seeler *et al.* 2007, Sarge und Park-Sarge, 2009]. Des Weiteren wurde eine Überexpression der an der SUMOylierung beteiligten Ligasen Ubc9 und E3 in verschiedenen Tumortypen sowie eine niedrigere Überlebensrate von Tumorkranken durch erhöhte Gehalte an E1-Ligase nachgewiesen [Kim und Baek, 2006; McDoniels-Silvers *et al.*, 2002; Lee und Thorgeirsson, 2004]. Das SUMO-System kontrolliert die Funktion einer Vielzahl in Tumorzellen fehlregulierter Proteine. HDAC's (Histondeacetylasen) gehören unter anderem auch zur Gruppe der SUMO-Substratproteine (HDAC 1 wird von SUMO 1 SUMOyliert) und sind auf Grund ihrer

Funktion bei Tumorerkrankungen von großem wissenschaftlichen Interesse. Weitere SUMO-Substratproteine sind in Tab.5 aufgelistet.

Tab.5: Auflistung einiger SUMO-Substratproteine [in Anlehnung an Hecker *et al.*, 2006; Schwienhorst, 2001]

Substrat	Auswirkung der SUMOylierung	Literatur
RanGAP1	Wechselwirkung mit RanGAP2 an der Kernpore	Matunis <i>et al.</i> , 1996 Mahajan <i>et al.</i> , 1997
I $\kappa$ B $\alpha$	Verhinderung des Abbaus von I $\kappa$ B $\alpha$	Hay <i>et al.</i> , 1999
NEMO	DNA-Schadensantwort; Transport in den Zellkern	Huang <i>et al.</i> , 2003
PCNA	Rekrutierung einer Helicase für DNA-Replikation	Papouli <i>et al.</i> , 2005
p53	Beeinflussung der Aktivität	Fogal <i>et al.</i> , 2000 Müller <i>et al.</i> , 2000
MDM2	Selbst-Ubiquitinylierung	Müller <i>et al.</i> , 2000 Hjerrild <i>et al.</i> , 2001
Topoisomerase I	Signal auf Topoisomerase I- vermittelte DNA-Schäden	Mao <i>et al.</i> , 2000

### 2.5.2.2 HDAC-SUMOylierung

Eine Beeinflussung der HDAC-Aktivität der HDACs kann durch SUMOylierungen erfolgen. So wurde gezeigt, dass zwei Lysinreste (Lys 444 und Lys 476) von HDAC1 durch SUMO E1 *in vitro* und *in vivo* SUMOyliert werden. Jedoch wird der SUMOylierungs-Effekt von HDAC1 in der Literatur kontrovers diskutiert. So führt eine SUMOylierung des HDAC1 Lysinrestes in einer Studie zu einer Reduzierung der transkriptionalen Repression durch HDAC1, in einer anderen Studie jedoch veränderte die gleiche Modifizierung die enzymatische Aktivität von HDAC 1 nicht [Colombo *et al.*, 2002; David *et al.*, 2002; Jeong, 2008]. Klasse II HDACs wie HDAC 4 und HDAC6 sind ebenso Zielstrukturen von SUMO E1 [Kirsh *et al.*, 2002]. Die Klasse II HDAC-Aktivität wird durch die Lokalisation der Enzyme bestimmt. Die HDAC 4 SUMOylierung findet im Bereich des Kernporen-Komplexes statt und ist mit der Translokation in den Zellkern verbunden.

## 2.6 Polyphenole

Polyphenole sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die der Pflanze sowohl als Schutz gegen Fressfeinde als auch als Lockmittel für Bestäuber dienen. Sie kommen als Pflanzenfarbstoffe (Flavonoide) und Geschmacksstoffe vor. Polyphenole zählen zu den aromatischen Verbindungen, die zwei oder mehrere an den aromatischen Ring gebundene Hydroxylgruppen enthalten. Dabei wird zwischen verschiedenen Untergruppen der Polyphenole unterschieden (Abb.34). Zum einen die Phenolsäuren und die Flavonoide, wobei letztere sich weiter in sieben Untergruppen untergliedern lässt. Polyphenolische Verbindungen kommen sowohl in der glykosidischen Form (an einen Zucker gebunden) als auch als Aglykon vor [Ross und Kasum, 2002].

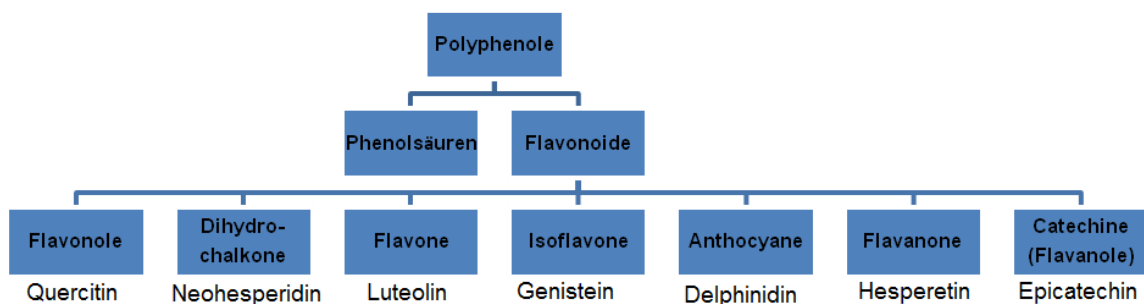


Abb.34: Gruppierung der Polyphenole in Phenolsäuren und Flavonoide mit jeweils einem Beispiel aus der Untergruppe

Flavonoide stellen die größte Klasse der Polyphenole dar. Sie haben die in Abb.35 gezeigte Grundstruktur. Daraus leiten sich die Strukturen der entsprechenden Untergruppen ab.

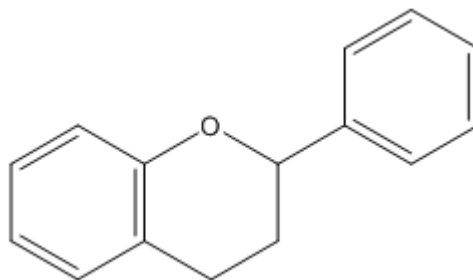


Abb.35: Grundstruktur der Flavonoide, Flavan

Der Mensch nimmt etwa 1 g/Tag an Polyphenolen auf, dabei zählt ein Drittel zu den Phenolsäuren und zwei Drittel zu den Flavonoiden. Damit ist die tägliche Aufnahme deutlich höher als bei anderen bekannten Antioxidantien; sie ist zehnmal höher als die Aufnahme von Vitamin C. Die größte Polyphenol Quelle sind Früchte und Getränke (Fruchtsäfte, Tee, Kaffee und Rotwein), aber auch Gemüse, Hülsenfrüchte und Getreide (Tab.6). Früchte wie Äpfel, Kirschen und verschiedene Beeren enthalten zwischen 200-300 mg Polyphenole pro 100 g Gewicht. Eine Tasse Tee oder Kaffee oder ein Glas Rotwein beinhaltet bis zu 100 mg an Polyphenolen [Scalbert und Williamson, 2000; Scalert *et al.*, 2005].

Tab.6: Verschiedene Lebensmittel und eine kleine Auswahl der enthaltenen Polyphenole [Moon *et al.*, 2006; Ross und Kasum, 2002]

Lebensmittel	Charakteristische Leitverbindungen	Menge
Kaffee	Kaffeesäure, Chlorogensäuren	500-800 mg/L [Olthof <i>et al.</i> , 2003]
Sojabohnen	Genistein	30-92 mg/ 100 g Frischgewicht [Horn-Ross <i>et al.</i> ,2000]
Kapern	Quercetin	1500 mg/kg [Sneyd, 2009]
Tee	Catechin, Gallocatechin	70 -210 mg/g [Lairon und Amiot, 1999]
Kartoffel	Chlorogensäuren	1400 mg/kg [Clifford,2000]
Heidelbeere	Anthocyane	420 mg/100 g Frischgewicht [Watzel <i>et al.</i> , 2002; Kahkonen und Heinonen, 2003]
Apfel	Phloridzin	10-50 mg/kg [Hyson,2011]

Polyphenole sind Reduktionsmittel und wirken zusammen mit anderen Reduktionsmitteln, wie z.B. Vitamin C oder Carotinoide, gegen oxidativen Stress. Viele degenerative Erkrankungen wie beispielsweise Krebs, Entzündungen, Herzerkrankungen, Osteoporose werden mit der Wirkung von oxidativem Stress und oxidativen Schäden der Zellen, der DNA, Proteinen und Lipiden in Verbindung gebracht. So zeigen epidemiologische Studien eine Korrelation zwischen dem Konsum von polyphenolreichem Essen bzw. Getränken und der Prävention verschiedener Erkrankungen. Die Struktur der Polyphenole ist dabei von größter Wichtigkeit, denn sie beeinflusst hauptsächlich die Bioverfügbarkeit, die antioxidative Aktivität und die spezifische Interaktion mit Zellrezeptoren und Enzymen [Scalbert und Williamson, 2000]. Antioxidantien in der Nahrung sind in der Lage diese oxidativen Schäden zu limitieren, indem sie direkt mit ROS (reaktive Sauerstoffspezies, "*reactive oxygen species*") reagieren. So kann die Phenolgruppe der Polyphenole ein Elektron aufnehmen und ein relativ stabiles Phenoxylradikal bilden. Polyphenole stehen in der Diskussion das Zellwachstum von Tumorzellen zu behindern und die Apoptose zu bewirken [Kang *et al.*, 2014; Bilecova-Rabajdova *et al.*, 2013]. Ebenso wird von einer Hemmung der Aggregation der Thrombozyten berichtet, die bei Erkrankungen des Herzens und bei Thrombosegefahr eine wichtige Rolle spielt [Fuentes *et al.*, 2014]. Weiter wird ihnen eine blutzuckerregulierende Wirkung zugeschrieben, da sie die Verdauung der Kohlenhydrate durch Hemmung des Stärke abbauenden Enzyms Amylase verlangsamen [Gao *et al.*, 2013; Williamson, 2013]. Manche Polyphenole wie Isoflavone haben eine leichte Östrogen-Aktivität und können präventiv bei der Behandlung von Osteoporose eingesetzt werden, da diese Erkrankung auf eine Östrogen-Unterversorgung bei Frauen nach der Menopause zurückgeführt wird [Ross und Kasum, 2002]. Polyphenolen wird in der Literatur eine Reihe biologischer Wirkungen zugeschrieben, Tab.7 soll einen Überblick über verschiedene Effekte *in vitro* und *in vivo* geben.

Tab.7: Auflistung verschiedener Wirkungen von Polyphenolen [in Anlehnung an Middleton *et al.*, 2000]

Wirkung	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	Literatur
antioxidativ	Untersuchung an HT29 Zellen und Ca2o-2 Zellen	Beeinflussung der Transkription von ARE-abhängigen Genen an Rattenleber- und Kolon  18 Probanden Studie	[Schäfer <i>et al.</i> , 2006]  [Bellion <i>et al.</i> , 2008]  [Soyalan <i>et al.</i> , 2011]  [Weisel <i>et al.</i> , 2006]
antiinflammatorisch	-	4-Wochen Interventionsstudie an 20 Erwachsenen	[Drummond <i>et al.</i> , 2013]
antiproliferativ	Quercetin hemmt Zellwachstum von Kolonkrebszellen	Studie an weiblichen Mäusen	[Hosokawa <i>et al.</i> , 1990]  [Wang <i>et al.</i> , 1995]
antimikrobiell	Wachstumshemmung <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Interventionsstudie mit Frauen	[Sakanaka <i>et al.</i> , 1996]  [Howell <i>et al.</i> , 1998]  Howell <i>et al.</i> , 2002]
chemopräventiv/ antikarzinogen	-	"Nurses Health" Studie  "Zutphen Elderly" Studie	[Feskanich <i>et al.</i> , 2000]  [Arts <i>et al.</i> , 2001]
Vermindertes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen  antithrombotisch	-	Studie an Hamstern  "Women's Health" Studie  "Zutphen Elderly" Studie	[Decorde <i>et al.</i> , 2008]  [Sesso <i>et al.</i> , 2003]  [Hertog <i>et al.</i> , 1993]
antiviral	<i>Herpes simplex</i> Virus Typ 1  Anti-HIV	-	[Kaul <i>et al.</i> , 1985]  [Gatto <i>et al.</i> , 2002]

Epidemiologische Studien zeigten, dass die erhöhte Nahrungsaufnahme von Polyphenolen über Früchte und Gemüse das Risiko für eine Krebserkrankung reduzieren kann. Es wurde gezeigt, dass Polyphenole chemopräventiv wirken und therapeutisch aktiv sind [Duthie *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001; Chen und Ping Dou, 2008]. Basierend auf den berichteten gesundheitlichen Nutzen der Polyphenole, erzielten Polyphenol-Präparationen auf dem Markt der Nahrungssupplementierung eine gesteigerte Popularität. Der Einfluss von Polyphenolen auf Enzyme der Zellzyklusregulation, der Apoptose, Metastasierung und Angiogenese wird mit ihren positiven Gesundheitseffekten in Verbindung gebracht. Es wurde berichtet, dass Polyphenole die Gentranskription durch posttranslationale Modifikationen (DNA-Methylierung oder Histonacetylierung/Deacetylierung) verändern können [Rajendran *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2010; Nandakumar *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2012]. Innerhalb der Klasse der Polyphenole wurde dem Grüntee-Catechin (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), dem Stilben Resveratrol (hauptsächlich in Trauben und Wein zu finden), verschiedenen Soja Isoflavonen und den Phenolsäuren wie Chlorogensäure (CGA) oder Kaffeesäure eine Beeinflussung der HDAC-Aktivität zugeschrieben, welche mit der Änderung des Histoncodes und der genomischen Stabilität bzw. einer möglichen Chemoprävention diskutiert wird [Link *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2010; Thakur *et al.*, 2012; Waldecker *et al.*, 2008].

In Folgenden werden nur die Polyphenole CGA, Genistein und EGCG, die in dieser Arbeit untersucht wurden, näher beschrieben.



## 2.6.1 Chlorogensäure (CGA)

Die Phenolsäure Chlorogensäure (CGA), auch 5-Kaffeoylchinasäure genannt, unterscheidet sich von Kaffeesäure durch die Esterbindung mit dem Chinasäurerest (Abb.36).

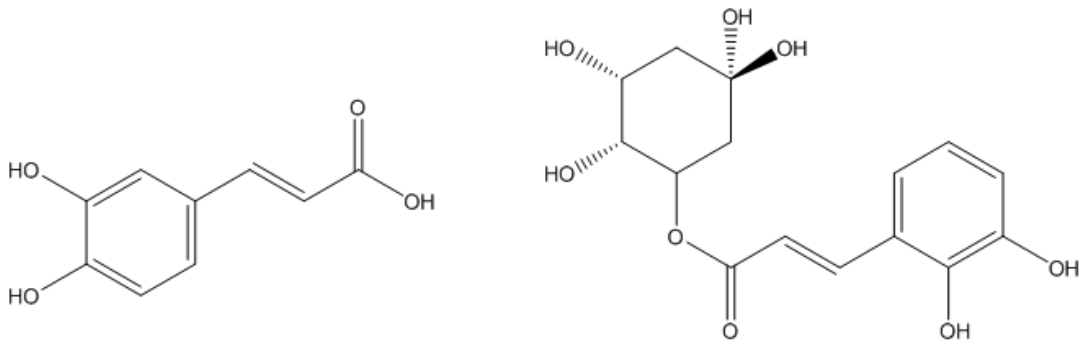


Abb.36: Struktur von Kaffeesäure und Chlorogensäure (CGA)

CGA kommt in verschiedenen Pflanzen, wie z.B. in Kaffee, Tabak-, Reben- und anderen Blättern, Obst und Kartoffeln vor [Eisenbrand *et al.*, 2006]. Trockene Kaffeebohnen der Sorte *Arabica* enthalten 3,0 - 5,6% CGA, während die Sorte *Robusta* nur 4,4 - 6,6% enthält [Belitz *et al.*, 2008]. In „Boskop“-Äpfeln werden Mengen von 62-385 mg/kg detektiert. In Kernobst kommt CGA oft als Hydroxyzimtsäure-Konjugat vor [Moeller *et al.*, 1983]. CGA ist eines der am meisten über die Nahrung aufgenommenen Polyphenole. Kaffee-Konsumenten nehmen über 1g /Tag CGA auf, während Verbraucher, die kein Kaffee trinken, unter 0,1 g/ Tag CGA zu sich nehmen [Clifford, 2000; Olthof *et al.*, 2001]. Eine Studie von Farah *et al.* zeigte, dass nur ein kleiner Prozentanteil der aufgenommenen CGA im Blut gefunden wird mit Plasmakonzentrationslevels im nanomolaren Bereich [Farah *et al.*, 2008].

In einer Untersuchung von Liu *et al.* wurde von dem Einfluss von CGA auf HDAC-Aktivität berichtet. Die HDAC-Aktivität des HeLa Kernextraktes wurde mit einem IC<sub>50</sub> Wert von 375 µM durch CGA gehemmt [Liu *et al.*, 2005]. Auch in einer Studie von Bora-Tatar wurde eine Inhibierung der HDAC-Aktivität des HeLa Kernextrakts bestätigt [Bora-Tatar *et al.*, 2009]. Bislang ist jedoch nichts über eine Regulation der HDAC-Aktivität im zellulären System bekannt. CGA zeigte jedoch eine signifikante Hemmung der DNA-Methylierung [Lee und Zhu, 2006].

## 2.6.2 Genistein

Genistein gehört zur Gruppe der Isoflavonide, welches aus einem Chromon-Derivat und einem Phenol besteht (Abb.37).

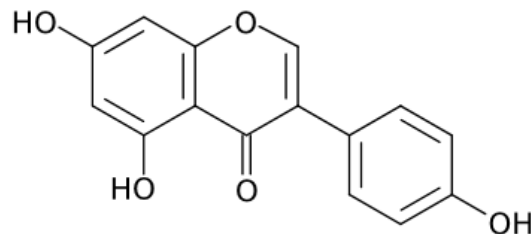


Abb.37: Strukturformel von Genistein

Genistein findet sich in sehr hohen Konzentrationen in Sojabohnen. Das Isoflavonoid besitzt eine schwach östrogene und antibakterielle Wirkung [Naguleswaran *et al.*, 2006]. Es wirkt auch als Calmodulin-Antagonist und Enzyminhibitor, und hemmt z.B. die Tyrosin-Kinase [Eisenbrand *et al.*, 2006]. Auch auf Grund seiner chemopräventiven/ chemotherapeutischen Eigenschaften in verschiedenen Tumortypen wird Genistein diskutiert [Prietsch *et al.*, 2014]. Im menschlichen Körper wird Genistein schnell resorbiert, metabolisiert und durch Nieren und Galle ausgeschieden. Der Metabolismus findet in der Leber in Form von Glucuronidierung statt, damit die Körperkonzentration sinken kann. Die Ausscheidung dauert, je nach Menge, einige Stunden bis einige Tage [Belitz *et al.*, 2008].

Die Aufnahme von Soja Isoflavonen wurde in Westlichen Industrieländern auf 1-3 mg/Tag geschätzt, diese Aufnahme ist um das 30-50fache geringer als in asiatischen Ländern [Degen *et al.*, 2002]. Eine Studie von Gardner *et al.* zeigte, dass nur ein geringer Anteil des aufgenommenen Genisteins ins Blut gelangt und nur Konzentrationen im nanomolaren Bereich detektiert werden konnten [Gardner *et al.*, 2009].

In verschiedenen Studien wurde Genistein und zahlreiche andere Isoflavone als HAT Aktivatoren und HDAC-Inhibitoren in Speiseröhren-, Prostata-, Brust-, und Nierenkrebszelllinie beschrieben [Kikuno *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2009; Majid *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2004].

### 2.6.3 (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG)

(-)- Epigallocatechin-3-gallat (EGCG) gehört zur Gruppe der Catechine, die vor allem in grünem Tee vorkommen (Abb.38).

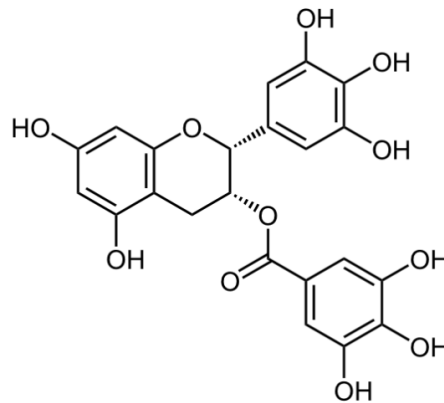


Abb.38: Strukturformel von EGCG

Frische Teeblätter enthalten 9-13% EGCG. Auf Grund unterschiedlicher Herstellung, sind die Mengen in Grünem Tee und Schwarzem Tee unterschiedlich [Belitz *et al.*, 2008]. Eine Tasse Grüntee (200 mL) enthält etwa 150 mg EGCG [Yang und Wang, 1993]. Die Biotransformation erfolgt in Form von Methylierung und Glucuronidierung, wobei die Metaboliten meistens Ringspaltungsprodukte sind, die durch die Darmflora weiter zu Phenylelessigsäure und Phenylpropionsäure abgebaut werden [Khan *et al.*, 2007]. In einer Studie von Lee *et al.* wurde gezeigt, dass nur geringe Menge des über die Nahrung aufgenommenen EGCGs in die Blutbahn gelangen (Konzentrationen im nanomolaren Bereich) [Lee *et al.*, 2002].

Über Grüntee Polyphenole insbesondere EGCG wurde berichtet, dass sie die HDAC-Aktivität, die mRNA Transkription von HDAC 1 und die Protein Expression der Klasse I HDACs in Prostatakrebszellen verringern [Pandey *et al.* 2010; Thakur *et al.*, 2012]. Die Behandlung von humanen Prostatakrebszellen (LNCaP) mit EGCG im Konzentrationsbereich von 5- 20  $\mu\text{M}$  zeigte eine dosis- und zeitabhängige Abnahme der Klasse I HDACs 1, 2, 3 und 8 [Thakur *et al.*, 2012].

## **2.7 Alkenylbenzene - Methyleugenol**

Im folgenden Kapitel wird näher auf die Gruppe der Phenylpropanoide insbesondere auf Methyleugenol, eingegangen, da die gentoxische Wirkung und die damit verbundenen Wirkmechanismen dieser Substanz und deren oxidative Metaboliten hauptsächlich Gegenstand dieser Arbeit sind.

### **2.7.1 Vorkommen von Methyleugenol**

Methyleugenol gehört zu der Gruppe der Phenylpropanoide und stellt ein substituiertes Alkenylbenzol dar. Es besitzt zwei Methoxy-Gruppen in Position 3 und 4 sowie eine ungesättigte C3-Seitenkette in Position 1 (Abb.39).

Phenylpropanoide kommen in der Natur als sekundäre Pflanzenstoffe vor. Von Pflanzen werden sie zur Verteidigung gegen Fressfeinde und Mikroorganismen und als Lockmittel für Bestäuber gebildet. Verschiedene Forschungen haben ergeben, dass Phenylpropanoide ausgehend von Phenylpropanolen über den Shikimat-Phenylalanin-Biosyntheseweg gebildet werden [Koeduka *et al.*, 2006].

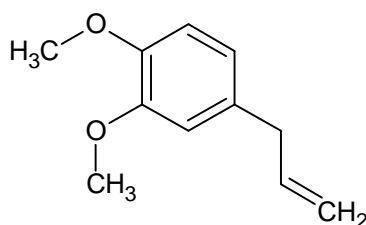


Abb.39: Strukturformel von Methyleugenol

Seit der Antike haben Menschen Phenylpropanoide zur Konservierung von Lebensmitteln, zum Würzen sowie als medizinische Produkte verwendet.

Methyleugenol kommt in verschiedenen Lebensmitteln und ätherischen Ölen vor, die in vielen Kräutern und Gewürzen enthalten sind, wie z.B. in Basilikum, Estragon, Lorbeer, Nelke, Limonengras, Fenchel, Anis, Sternanis, Muskatnuss, Piment und Zimt [Gardner *et al.*, 1997; NTP, 2000; Jeurissen *et al.*, 2006].

Oftmals findet sich Methyleugenol zusammen mit verschiedenen Stoffen aus der Klasse der Phenylpropanoide in Lebensmitteln, wie beispielsweise in Piment:

50 - 80% Eugenol, 4 - 7%  $\beta$ -Caryophyllen, 3 - 28% Methyleugenol, 1,8-Cineol und  $\alpha$ -Phellandrien (die quantitativen Angaben beziehen sich auf die Zusammensetzung des ätherischen Öls) [Belitz *et al.*, 2008]. Methyleugenol wurde in Mengen von 2,6%, 3,7%, 13% und 0,8% in ätherischen Ölen von Basilikum, Lorbeerblättern, Piment (Beeren) und Muskatnuss nachgewiesen [Smith *et al.*, 2002; Al-Subeihi *et al.*, 2012].

In manchen pflanzlichen Ölen, wie zum Beispiel in den Baumölen von *Dacrydium franklinii* Hook, *Melaleuca bracteata* und *Cinnamomum oliveri*, kommt es als Hauptkomponente in Gehalten von 90% bis 98% (in Bezug auf das ätherische Öl) vor.

Zudem kommt Methyleugenol in Früchten und Gemüse vor, so leistet es zum vollmundig, milden Aroma der Banane einen Beitrag [Belitz *et al.*, 2008].

In Form von natürlichen, ätherischen Ölen wird Methyleugenol als Aroma- und Geschmacksstoff in Götterspeise, Pudding, Backwaren, Bonbons, Kaugummi, nicht alkoholischen Getränken, Würzen und in Eiscreme verwendet. Weiterhin findet es Verwendung als Duftstoff in Parfums, Cremes, Lotionen, Kosmetika, Shampoos, Seifen und Kräuterprodukten [NTP, 2000; Burkey *et al.*, 2000].

Laut §2 Abs.2 der Aromenverordnung darf Methyleugenol in Deutschland als solches „bei der Herstellung von Aromen und anderen Lebensmitteln gewerbsmäßig nicht verwendet werden“ [BGB1. I 2006,1133]. Ausgenommen von dieser Regelung sind normale Gehalte in natürlichen ätherischen Ölen unter der Voraussetzung, dass die Konzentration bestimmte Werte nicht übersteigt. So wurde ausgehend von den Gehalten in ätherischen Ölen und unter Berücksichtigung bestimmter Expositionsszenarien vom SCCNFP (Wissenschaftlichen Ausschuss „Kosmetische Mittel für den Verbraucher bestimmte Non-Food-Erzeugnisse“) für verschiedene Produkte Höchstgehalte festgelegt, der maximale Gehalt für Parfum liegt bei 0,01%, für Eau de Toilette bei 0,004%, für abwaschbare Mittel bei 0,001% und für Mundpflegemittel bei 0,002% [BfR, 2001; BgVV, 2001, BGB1. I 2010, 2193].

In den USA wird Methyleugenol als Duftstoff und Gewürzinhaltsstoff seit 1920 verwendet und wurde 1965 von der „*Flavor and Extract Manufacturers Association*“ (FEMA) als „*Generally Recognized As Safe*“ (GRAS) klassifiziert [Burkey *et al.*, 2000].

## 2.7.2 Exposition mit Methyleugenol

Durch die vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten besteht ein hohes Potential für die menschliche Exposition, dabei geht der größte Anteil von den Lebensmitteln aus. Die genaue Konzentration an Methyleugenol in verschiedenen Lebensmitteln kann jedoch nicht abgeschätzt werden, so wird in der Literatur ein Wert zwischen 4,8 - 5,2 ppm oder sogar ein Wert über 40 ppm angegeben [Feranoli, 1975]. Der größte Anteil der Exposition durch Lebensmittel geht von Kräutern und Gewürzen aus; ein geringer Teil von Obst und Gemüse, sowie durch die Zugabe von natürlichen ätherischen Ölen in Speisen und Getränke [Smith *et al.*, 2010].

Insgesamt wird von einer Exposition des Menschen in Mengen zwischen 1 µg/kg KG/Tag und 10 µg/kg KG/Tag ausgegangen [Smith *et al.*, 2002].

Andere Quellen geben einen Wert der täglichen Aufnahme von 0,26 µg/kg KG an [Stofberg und Grundschober, 1987]. Das SCF ermittelte einen Wert von 186 µg/kg KG/Tag und im 97,5 Perzentil einen Wert von 514 µg/kg KG/Tag [SCF, 2001].

In der Studie von Smith *et al.* wurde versucht ein MOE für Methyleugenol abzuschätzen. Für diese Kalkulation wurde von einer täglichen Aufnahme von 10 µg/kg KG [Smith *et al.*, 2002] und einer theoretischen Höchstdosis von 66 µg/kg KG ausgegangen [Smith *et al.*, 2010]. Zunächst wurde ein T25-Wert von 57 mg/kg KG/Tag errechnet. Mit Hilfe des berechneten BMDL<sub>10</sub> mit 7,9 mg/kg KG/Tag konnte für die tägliche Aufnahme von 10 µg/kg KG ein MOE von 800 abgeschätzt werden, während für Konsumenten mit einer erhöhten täglichen Aufnahme ein MOE von 100 abgeschätzt wurde [Smith *et al.*, 2010]. Liegt der MOE wie in diesem Fall weit unter 10.000, so wird von einem hohen gesundheitlichen Risiko ausgegangen und es müssen starke Minimierungsmaßnahmen getroffen werden [EFSA, 2005].

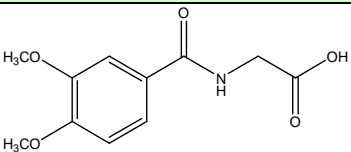
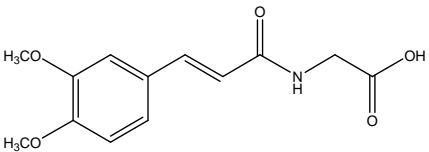
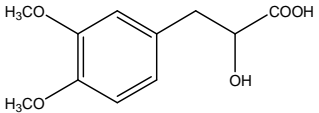
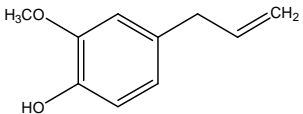
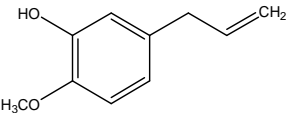
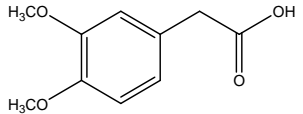
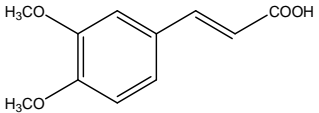
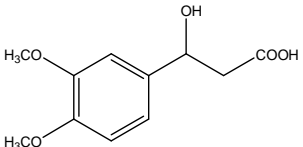
In einer anderen Studie wurde ein BMDL<sub>10</sub> Wert basierend auf den Daten des NTP [NTP, 2000] zwischen 49- 74 mg/kg KG/Tag bei weiblichen Ratten und 15-34 mg/kg KG/Tag bei männlichen Ratten geschätzt [van den Berg *et al.*, 2011]. Basierend auf einer täglichen Aufnahme von 0,014 mg/kg KG wurde ein MOE Wert ermittelt, der für weibliche Ratten zwischen 3500 und 5300 und für männliche Ratten zwischen 1100 und 2400 liegt [Al-Subeihi *et al.*, 2013]. Weiter wurde darüber diskutiert, dass Methyleugenol nicht als Reinsubstanz aufgenommen wird, sondern in einer

Lebensmittelmatrix, welche auch beispielsweise Flavonoide wie Nevadensin enthalten können. Nevadensin wurde als Sulfotransferase (SULT) Hemmstoff identifiziert [Alhusainy *et al.*, 2010]. In einer Studie von Al-Subeihi *et al.* wurde das Ratten PBBK-Modell ("*physiologically based biokinetic model*"), welches die Bioaktivierung und Detoxifizierung von Methyleugenol in männlichen Ratten beschreibt, und das PBBK-Modell für Nevadensin, welches die dosisabhängige Kinetik von Nevadensin in männlichen Ratten beschreibt, kombiniert. Dabei wurde eine Reduktion der Methyleugenol-DNA-Adduktbildung (ME-3'-N<sup>2</sup>-dG: N<sup>2</sup>-(transmethyloisoeugenol-3'-yl)-2'-deoxyguanosin) verbunden mit einer Reduktion der Leberkarzinomen-Bildung festgestellt, welche auf der Nevadensin vermittelten Inhibition der Bioaktivierung von Methyleugenol zu seinem DNA reaktiven karzinogenen Metaboliten beruht. Auf Grundlage dieser Daten wurde ein BMDL<sub>10</sub> Wert zwischen 159 und 254 mg/kg KG/Tag für weibliche Ratten und zwischen 129 und 142 mg/kg KG/Tag für männliche Ratten bestimmt. Zusammen mit der täglichen Aufnahme von 0,014 mg/kg KG wurde ein MOE für weibliche Ratten von 11.000-18.000 und für männliche Ratten zwischen 9.200 und 10.000 berechnet. Die Co-Regulierung von Nevadensin zusammen mit Methyleugenol erhöht folglich die MOE Levels. Dies führt zu einer geringen Priorität für das Risikomanagement im Vergleich zur MOE Kalkulation, welche auf den Daten mit Methyleugenol als Reinsubstanz beruhen [Al-Subeihi *et al.*, 2013].

## 2.7.3 Metabolismus von Methyleugenol

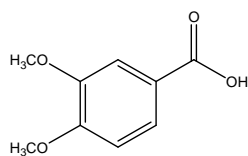
Solheim und Scheline untersuchten den *in vivo* Metabolismus von Methyleugenol an männlichen Wistar-Ratten sowohl nach oraler als auch nach intraperitonealer (i.p.) Gabe von 200 mg/kg KG Methyleugenol. Folgende Metabolite (Tab.8) konnten (nach Dekonjugation mit Sulfatase/Glucuronidase) aus dem gesammelten 24-Stunden-Urin detektiert werden [Solheim und Scheline, 1976]:

Tab.8: Metabolite aus gesammelten 24h-Urin [Solheim und Scheline , 1976]

Metabolit	Struktur	Gehalt (%)
3,4-Dimethoxybenzoylglycin		30
3,4-Dimethoxycinnamoylglycin		24
3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-hydroxypropionsäure		20
Eugenol		7
Chavibetol		4
(3,4-Dimethoxyphenyl)-Essigsäure		3
Dimethoxyzimtsäure		2
3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-hydroxypropionsäure		2

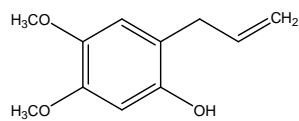


3,4-Dimethoxybenzoesäure



2

6-Hydroxymethyleugenol



1

Der *in vitro* Metabolismus von Methyleugenol wurde in der Arbeit von Cartus, 2009 untersucht. Er inkubierte Lebermikrosomen verschiedener Spezies (Ratte, Rind und Mensch; ohne metabolische Aktivierung) drei Stunden mit Methyleugenol und identifizierte die in Tab.9 gezeigten Phase-I-Metaboliten.

Tab.9: Phase-I-Metabolite [Cartus *et al.*, 2012]

Metabolit	Struktur	Gehalt
Eugenol		6%
Isoeugenol		n.d.
1'-Hydroxymethyleugenol		20%
3'-Hydroxymethylisoeugenol		20%
Methyleugenol-2',3'-epoxid		-
6-Hydroxymethyleugenol		20%
1'-Oxomethyleugenol		-
3'-Oxomethylisoeugenol		-
3,4-Dimethoxyzimtsäure		-
2',3'-Dihydroxymethyleugenol		3%
Chavibetol		6%
6-Hydroxymethylisoeugenol		-

Es zeigte sich, dass eine längere Inkubationszeit (24 h) eine verminderte Wiederfindung der Metaboliten in Abhängigkeit der Konzentration zur Folge hatte [Cartus, 2009]. Die Abnahme kann darauf zurückgeführt werden, dass ein Teil der gebildeten Metabolite zu reaktiven Spezies (z.B. Epoxid) weiter reagieren, welche auf Grund ihrer elektrophilen Eigenschaft an mikrosomale Proteine binden und analytisch so nicht erfasst werden [Gardner *et al.*, 1996].

Der 1'-Hydroxy-Metabolit geht als einer der Hauptmetabolite aus der Studie von Cartus *et al.* hervor, seine mikrosomale Bildung wird bereits in der Literatur beschrieben [Borchert *et al.*, 1973]. Weiterhin wird dieser Metabolit für die Kanzerogenität des Methyleugenols verantwortlich gemacht [Jeurissen *et al.*, 2006]. In der Studie von Solheim und Scheline konnte im Urin der Tiere 1'-Hydroxymethyleugenol (wie auch 3'-Hydroxymethylisoeugenol und 2,3-Dihydroxymethyleugenol) nicht identifiziert werden, jedoch in deren Gallenflüssigkeit.

In der Studie von Cartus *et al.* wurde *in vitro* 3'-Oxomethylisoeugenol als Metabolit identifiziert; im Tierversuch konnte dieser nicht nachgewiesen werden [Solheim und Scheline, 1976]. Auch in der Inkubation an Mikrosomen konnte 3'-Oxomethylisoeugenol eruiert werden, jedoch nicht in der Inkubation an primären Rattenhepatozyten. Dieser Metabolit kann vermutlich mit andern Aminosäuren und Proteinen reagieren, was in der Lebertoxizität und Halbantigen Bildung eine Rolle spielen kann [Cartus *et al.*, 2012]. Weiter wurde *in vitro* auch (RS)-2',3'-dihydroxy-2',3'-dihydromethyleugenol (Diol) detektiert [Cartus *et al.*, 2012], das Vorprodukt des Diols Methyleugenol-2',3'-epoxid konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Inkubation des Methyleugenol-2',3'-epoxids an Aroclor 1254 behandelten Rattenlebermikrosomen führte zur vollständigen Umwandlung zum Diol. Da das Diol jedoch nicht in den Kontrollexperimenten mit hitze-inaktivierten Mikrosomen detektiert werden konnte, wird davon ausgegangen, dass mikrosomale Epoxidhydrolasen für die Umwandlung notwendig sind [Cartus *et al.*, 2012]. Es wurde bereits in anderen Untersuchungen berichtet, dass die Epoxide von Allylbenzenen wie Estragol und Safrol Substrate für mikrosomale Epoxidhydrolasen darstellen [Luo *et al.*, 1992].

In einer Untersuchung von Al-Subeihi *et al.* wurden aus Lunge, Leber und Niere isolierte Mikrosomen der Ratte mit Methyleugenol inkubiert. Es wurde beobachtet,

dass die stärkste Anzahl an Metaboliten durch den Umsatz mit Lebermikrosomen erreicht wurde (Anzahl an Metaboliten siehe Tab.7). In den Mikrosomen der Lunge wurden die Metabolite Eugenol und 3-Hydroxy-4-methoxyallylbenzol und in der Niere Methyleugenol-2',3'-epoxid charakterisiert.

Im Weiteren wurde in einer Studie die Bioaktivierung und Detoxifizierung von Methyleugenol erforscht (PBBK-Modell). Dazu wurden Lebermikrosomen von männlichen Sprague Dawley Ratten mit Methyleugenol inkubiert und auf Metabolite untersucht. Hier wurde festgestellt, dass die Bildung der einzelnen Metabolite in den Lebermikrosomen konzentrationsabhängig ist (Tab.10). So geht 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-propen-1-ol (32,9%) bei niedrigen Dosen (0,05 mg/kg KG) als Hauptmetabolit hervor gefolgt von Methyleugenol-2',3'-epoxid (31%), während im hohen Dosisbereich von 300 mg/kg KG die Menge an 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-propen-1-ol stark sinkt (19,8%) und 1'-Hydroxymethyleugenol mit 30,8% in den Vordergrund rückt [Al-Subeihi *et al.*, 2011].

Tab.10: Metabolite aus Lebermikrosomen der Ratte in hohem und niedrigem Dosisbereich [Al-Subeihi *et al.*, 2011]

<b>Metabolit</b>	<b>Gehalt nach hoher Dosis (300 mg/kg KG) [%]</b>	<b>Gehalt nach niedriger Dosis (0,05 mg/kg KG) [%]</b>
Methyleugenol-2',3'-epoxid	32,8	31,0
1'-Hydroxymethyleugenol	30,8	17,6
3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-propen-1-ol	19,8	32,9
2-Hydroxy-4,5-dihydroxymethyleugenol	7,4	11,4
M6 (nicht identifizierter Metabolit)	4,1	2,3
3-Hydroxy-4-methoxyallylbenzol	3,5	3,4

Andere Studien von NTP, 2000, Cran und Caldwell, 1992 und Gardner *et al.*, 1997 gehen im Besonderen auf die folgenden Metabolite ein: 1'-Hydroxymethyleugenol, Methyleugenol-2',3'-epoxid und der Chinon-Methid-Metabolit. Diesen Metaboliten wird ein hohes kanzerogenes und mutagenes Potential zugesprochen.

Von äußerster Wichtigkeit scheint der 1'-Hydroxy-Metabolit zu sein. Er wird durch Hydroxylierung des 1'-Kohlenstoffatoms der Allylseitenkette gebildet (Abb.40). Diese Reaktion wird von CYP 450 Enzymen katalysiert, im Besonderen von CYP 450 1A2, 2C9, 2D6 und 2C19 [Jeurissen *et al.*, 2006]. Der gebildete Alkohol wird enzymatisch durch Sulfotransferasen sulfoniert und es entsteht ein instabiles Intermediat, welches spontan in wässriger Umgebung zum elektrophilen Carbokation zerfällt. Dieses gilt als ultimates Kanzerogen, welches an Makromoleküle wie DNA und Proteine binden kann [Gardner *et al.*, 1997].

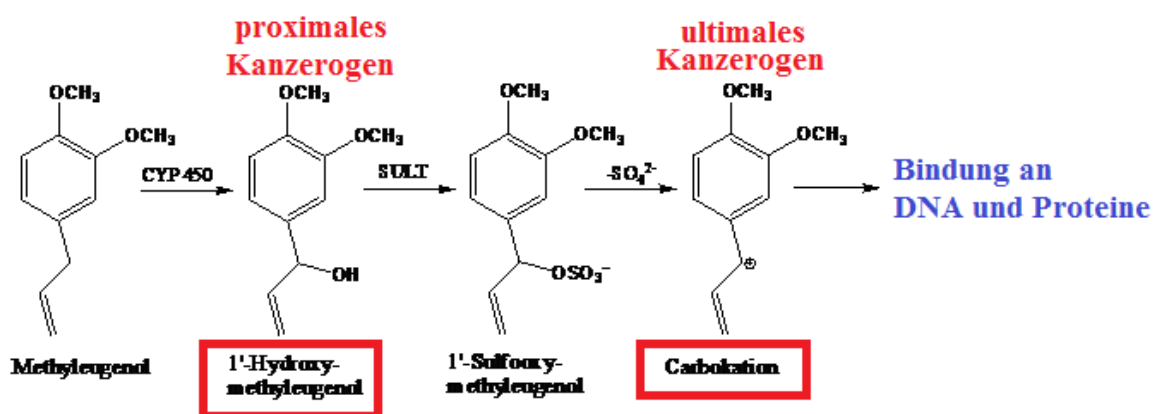


Abb.40: Bioaktivierung von Methyleugenol  
[modifiziert nach Jeurissen *et al.*, 2006]

Methyleugenol-2',3'-epoxid entsteht durch die CYP 450 katalysierte Epoxidierung der Seitenkette. Während Epoxide im Allgemeinen eine hohe Reaktivität mit zellulären Verbindungen zeigen, ist das Methyleugenol-2',3'-epoxid relativ stabil [NTP, 2000].

Auch eine O-Demethylierung des Methyleugenols zu Eugenol oder 3-Hydroxy-4-methoxyallylbenzen ist möglich, diese Metabolite können dann als Sulfate oder Glucuronidsäure Konjugate ausgeschieden werden [Smith *et al.*, 2002; Al-Subeihi *et al.*, 2012]. Das Methyleugenol-2',3'-epoxid kann über Epoxidhydrolasen, welche das

Epoxid zum Dihydrodiol umformen, oder als GSH (Glutathion)-Konjugat detoxifiziert werden [Luo und Guenther, 1995].

In der Bioaktivierung und Detoxifizierungsuntersuchung an Rattenlebermikrosomen von Al-Subeihi *et al.* wurde festgestellt, dass der 1-Hydroxymetabolit durch  $\beta$ -Glucuronidase zum 1'-Hydroxymethyleugenol-Glucuronid metabolisiert wird. Auch andere Metabolite wie 1'-Oxomethyleugenol zeigten eine GSH-Addukt Bildung in Mikrosomen der Rattenleber. Ebenso wurde das GSH-Konjugat des Carbokations von 1'-Sulfooxymethyleugenol nach Inkubation mit Rattenleber S9 Präparation nachgewiesen [Al-Subeihi *et al.*, 2011].

Auch das PBBK-Model an humanen Lebermikrosomen zeigte die Phase-II Metabolisierung zu Glucuroniden und GSH-Konjugaten. Es konnte weiter festgestellt werden, dass die Oxidation und anschließende Konjugation zu 1'-Hydroxymethyleugenol-Glucuronid den bevorzugten Umwandlungsweg im Vergleich zur Sulfonierung zu 1'-Sulfooxymethyleugenol darstellt [Al-Subeihi *et al.*, 2012].

## 2.7.4 Toxizität von Methyleugenol

### 2.7.4.1 Akute Toxizität

Die akute Toxizität von Methyleugenol wurde in einer Studie von Jenner *et al.* näher untersucht. Vor der Verabreichung von Methyleugenol wurden männliche und weibliche Osborne-Mendel Ratten (in zehner Gruppen) ca. 18 Stunden nüchtern gesetzt. Die Dosen (1170 mg/kg - 2070 mg/kg) wurden durch eine Schlundsonde verabreicht. Die Ratten wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen unter Beobachtung gehalten, während dieser Zeit wurde die Entwicklung toxischer Symptome verfolgt und die Zeit des Todeseintrittes registriert.

Für Methyleugenol wurde ein LD<sub>50</sub> von 1560 mg/kg KG festgelegt. Die Ratten fielen eine Stunde nach der Behandlung ins Koma und der Tod trat nach weniger als acht Stunden ein [Jenner *et al.*, 1964].

Für Mäuse wurde der Median für die letale orale Dosis bei 540 mg/kg KG bestimmt. Reines Methyleugenol rief weder Irritationen am Auge noch auf der Haut hervor [NTP, 2000].

### 2.7.4.2 Subchronische und chronische Toxizität

In einer 14-Wochen Studie wurde fünf Tage pro Woche Methyleugenol an weibliche und männliche F344/N Ratten in Dosen von 0, 10, 30, 100, 300 und 1000 mg/kg KG über eine Schlundsonde verabreicht. Alle Ratten überlebten bis zum Ende der Studie. Jedoch wurde bei den Tieren, die mit den beiden höchsten Dosen behandelt wurden, eine signifikante Reduzierung des Körpergewichtes (von etwa 9% bzw. 30%) beobachtet. Pathologische Untersuchungen der Tiere zeigten Leberschädigungen und Gewichtszunahmen der Leber in Dosen von 100 mg/kg KG und höher. Der NOEL von Methyleugenol wurde auf 10 mg/kg KG/Tag festgelegt [Abdo *et al.*, 2001].

Aus einer 90-Tage Studie an weiblichen und männlichen F344 Ratten und B6C3F1 Mäusen wurde ein LOAEL Wert von 100 mg/kg KG bestimmt [NTP, 2000].

### 2.7.4.3 Zytotoxizität

Burkey *et al.* untersuchte unter anderem die Zytotoxizität an isolierten Hepatozyten der Ratte mit Hilfe des LDH (Laktatdehydrogenase) Tests. Dieser Test beruht auf der Freisetzung der zytosolischen LDH in den extrazellulären Raum bei Zellläsionen (Schädigung der Zellmembran); damit ist die Konzentration an LDH im Medium ein Maß für die Zytotoxizität einer Substanz. Bei diesem Test wurde Methyleugenol im Konzentrationsbereich bis 3 mM als gering zytotoxisch charakterisiert. Auch auf Hepatozyten der Maus hatte Methyleugenol eine geringe zytotoxische Wirkung bis 1 mM, mit einem Anstieg auf 80-90% LDH-Ausstrom in Konzentrationen von 3 mM bis 5 mM [Burkey *et al.*, 2000]. In der Studie von Cartus *et al.* wurde im LDH-Test nach 24-stündiger Inkubation an primären Rattenhepatozyten erst in Konzentrationen  $\geq 2000 \mu\text{M}$  zytotoxische Eigenschaften festgestellt. Im Resazurintest an primären Rattenhepatozyten konnte ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $307 \pm 52 \mu\text{M}$  berechnet werden [Cartus *et al.*, 2012]. Auch der Hauptmetabolit 1'-Hydroxymethyleugenol zeigte an primären Rattenhepatozyten im LDH- Und Resazurintest mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von  $93 \pm 33 \mu\text{M}$  und  $46 \pm 14 \mu\text{M}$  deutlich zytotoxische Effekte [Cartus *et al.*, 2012]. Hingegen konnte im WST-1 ("water soluble tetrazolium salt 1")- Test an V79 Zellen (Lungenfibroblasten des männlichen chinesischen Hamsters) keine zytotoxischen Effekt von 1'-Hydroxymethyleugenol in Konzentrationen bis  $100 \mu\text{M}$  detektiert werden und auch im SRB-Test zeigte sich keine Wachstumshemmung in Konzentrationen bis  $100 \mu\text{M}$  nach 72 Stunden [Groh *et al.*, 2012]. Die anderen Metabolite Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol zeigten an primären Rattenhepatozyten erst in höheren Konzentrationen zytotoxische Effekte. So wurde im LDH- und Resazurintest ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $1478 \pm 422 \mu\text{M}$  bzw.  $328 \pm 58 \mu\text{M}$  für 3'-Oxomethylisoeugenol und  $1342 \pm 453$  bzw.  $310 \pm 2,8 \mu\text{M}$  für Methyleugenol-2',3'-epoxid angegeben [Cartus *et al.*, 2012]. An V79 Zellen wurden hingegen im WST-1 Test in niedrigen Konzentration zytotoxische Effekte nach Inkubation mit diesen Metaboliten nachgewiesen werden. Für Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol wurde in der höchsten getesteten Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  ein deutlicher Rückgang der Zellviabilität detektiert. Beim SRB Test an V79 Zellen wurde ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert nach 72-stündiger Inkubation für Methyleugenol-2',3'-epoxid von  $82 \pm 25 \mu\text{M}$  und für 3'-Oxomethylisoeugenol von  $69 \pm 4 \mu\text{M}$  ermittelt.



#### 2.7.4.4 Reproduktions- und Entwicklungstoxizität

Sowohl zur Reproduktions- als auch zur Entwicklungstoxizität gibt es bislang keine toxikologischen Daten [SCF, 2001].

#### 2.7.4.5 Kanzerogenität und Gentoxizität

Methyleugenol zeigte kontroverse Ergebnisse in einigen *in vitro* Mutagenitätstests wie beispielsweise im Ames *Salmonella typhimurium* Test und im *Escherichia coli* Reversion Mutation Test ohne oder mit metabolischer Aktivierung [Brennan *et al.*, 1996; Dorang *et al.*, 1977; Mortelmann *et al.*, 1986; Schiestl *et al.*, 1989; Sekizawa und Shibamoto, 1982]. In einer Studie von Hermann *et al.* konnte gezeigt werden, dass Methyleugenol mutagen im Ames *Salmonella typhimurium* Test des Stammes TA100 ist, welcher verschiedene SULTs exprimiert; insbesondere humane SULT1A1 und SULT1C2, die 1'-Hydroxymethyleugenol in DNA reaktive Metaboliten umwandeln können. Aber auch der Metabolit 1'-Hydroxymethyleugenol zeigte mutagenes Potential im Ames Test mit humaner SULT1A1 und SULT1C2 [Hermann *et al.*, 2012]. Weiter zeigte Methyleugenol gentoxisches Potential im UDS ("unscheduled DNA synthesis") -Test an Rattenhepatozyten in einem Konzentrationsbereich zwischen 10 µM und 500 µM [Burkey *et al.*, 2000].

In der Einzelzellgelelektrophorese an V79 Zellen zeigte sich nach ein- und 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol eine signifikante DNA-strangbrechende Wirkung in Konzentrationen  $\geq 25$  µM. Auch die Metaboliten 1'-Hydroxymethyleugenol und Methyleugenol-2',3'-epoxid zeigten nach Kurz- und Langzeitinkubation eine erhöhte DNA-Strangbruchrate in Konzentrationen  $\geq 10$  µM. 3'-Oxomethylisoeugenol induziert erst nach 24-stündiger Inkubation DNA-Schäden in Konzentrationen  $\geq 10$  µM [Groh *et al.*, 2012]. Weiter induzierten die Metabolite Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol Mikrokerne in V79 Zellen.

Auch zeigte sich in einer *in vivo* Mutagenitätsuntersuchung an weiblichen und männlichen gpt delta transgenen Ratten ein signifikanter Anstieg von Punktmutationen in der 100 mg/kg Dosis-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe [Jin *et al.*, 2012].

In mehreren Studien an Nagern hat sich bestätigt, dass Methyleugenol ein Kanzerogen ist, welches Tumore in Leber, Haut, Niere und Brustdrüse induziert [Cran und Caldwell, 1992; NTP, 2000; SCF, 2001].

So wurde eine zweijährige Studie an F344 Ratten und B6C3F<sub>1</sub> Mäusen durchgeführt. Bei dieser Studie trat in beiden höchsten Dosisgruppen (150 mg/kg /Tag und 300 mg/kg /Tag) eine stark erhöhte Mortalität auf. Als Endpunkt der Studie wurden Leberneoplasien, Leberkarzinome, benigne und maligne neuroendokrine Tumore und Hyperplasien erfasst [NTP, 2000].

Weiter wurde in einer 16-Wochen Studie von Williams *et al.* an männlichen F344 Ratten untersucht, ob es sich bei Methyleugenol um einen Initiator oder Promotor für die Induzierung von Tumoren handelt. Hier konnte gezeigt werden, dass Methyleugenol als Initiator für Leberkarzinome agiert. So wurde eine Gruppe nach Gabe von Methyleugenol mit 500 ppm Phenobarbital (ein Promotor) behandelt, um Leberneoplasien auszulösen. In der mittleren und hohen Dosisgruppe traten hepatische Adenome auf, die nach Behandlung mit Phenobarbital größer und vielzähliger waren als in der Kontrollgruppe. [Williams *et al.*, 2013].

Durch die Inkubation von CHO-Zellen (Hamster Ovarien; mit metabolischer Aktivierung) mit Methyleugenol wurden Schwesterchromatid-Austausche induziert [BfR, 2001; NTP, 2000; Robison *et al.*, 2006]. Methyleugenol zeigte jedoch in CHO Zellen ( $\pm$  metabolischer Aktivierung) kein klastogenes Potential [NTP, 2000; Robison *et al.*, 2006]. Auch in einer *in vivo* Studie konnte im Knochenmark von männlichen und weiblichen B6C3F<sub>1</sub> Mäusen keine klastogene Wirkung festgestellt werden [NTP, 2000; Robison *et al.*, 2006].

In mehreren <sup>32</sup>P-Postlabeling Assays wurde gezeigt, dass Methyleugenol an DNA binden kann und eine hohe Affinität zur DNA aufweist [NTP, 2000]. Auch in einer Untersuchung von Zhou *et al.* wurde gezeigt, dass Methyleugenol an humaner zellulärer DNA Addukte bildet [Zhou *et al.*, 2007]. Ebenso zeigte sich, dass Methyleugenol in der Rattenleber DNA-Addukte bilden kann [Williams *et al.*, 2013]. In einer Studie von Cartus *et al.* konnte nachgewiesen werden, dass Methyleugenol DNA-Addukte an Desoxyadenosin (dA) und Desoxyguanosin (dG) in primären Rattenhepatozyten bildet. 1'-Hydroxymethyleugenol ist der potenteste DNA-Addukt-Bildner im Vergleich zu den anderen Metaboliten; ebenso konnte für

3'-Oxomethylisoeugenol eine DNA-Addukt-Bildung zum dG detektiert werden [Cartus *et al.*, 2012]. In einer *in vivo* Studie an Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Bildung der  $N^2$ -(*trans*-methylisoeugenol-3'-yl)-2'-desoxyguanin ( $N^2$ -MIE-dG) Addukte und der weniger gebildeten  $N^6$ -(*trans*-methylisoeugenol-3'-yl)-2'-desoxyadenosin ( $N^2$ -MIE-dA) Addukte abhängig von der Exprimierung SULT1A Enzyme ist. Dabei konnte eine stärkere Adduktbildung bei humanen SULT1A1/2 gezeigt werden als bei SULT1a1 der Maus [Herrmann *et al.*, 2013].

In Untersuchungen humaner Leberproben aus Biopsien von 30 Probanden wurden Methyleugenol-DNA-Addukte detektiert, die auf die natürliche Exposition (Ernährung) zurückgeführt werden konnten. Der maximale und mediane Level dieser Addukte lag bei 37 und 13 pro  $10^8$  Nukleosiden, folglich bei 4700 und 1700 Addukten pro diploiden Genom ( $6,6 \times 10^9$  Basenpaaren). Diese Anzahl an Addukten liegt im Bereich der Niveaus der  $TD_{50}$  Werten verschiedener Leberkarzinogene in Nagern. Es gibt keine Daten zu den Ernährungsgewohnheiten der Probanden, da die Biopsieproben aus einer Studie zur Biotransformation und Transport von Xenobiotika stammten [Herrmann *et al.*, 2013].

In einer Studie von Ding *et al.* wurde eine *in vivo* Einzelzellgelelektrophorese an F344 Ratten durchgeführt. Den Ratten wurde hierzu Methyleugenol in Konzentrationen bis 2000 mg/kg KG verabreicht. Danach wurden die Ratten nach drei, sechs oder acht Stunden getötet und die Leber untersucht. Hier zeigte sich in der höchsten Dosis-Gruppe von 2000 mg/kg KG (Tötung nach sechs- und acht Stunden) ein signifikanter Anstieg der Endonuklease III sensitiven DNA-Schäden. Endonuklease III ist ein Enzym für die Detektion von oxidativen Schäden an Pyrimidinbasen. Desweiteren wurde eine Hemmung der Transkription verschiedener Gene, welche als Marker für DNA-Schäden und DNA-Reparatur dienen, nach dreistündiger Inkubation nachgewiesen werden [Ding *et al.*, 2011].

Auf Grund dieser Studienergebnisse wird Methyleugenol als gentoxisches Kanzerogen klassifiziert, wobei die Wirkungen vor allem auf die Metabolite zurückgeführt werden [NTP, 2000; Gardner *et al.*, 1996; BgVV, 2002].

### **3. Problemstellung**

Methyleugenol kommt in verschiedenen Kräutern und Gewürzen wie Basilikum, Fenchel, Sternanis und Estragon vor. Es findet in Form von natürlichen ätherischen Ölen sowohl als Aroma- und Geschmacksstoff in Lebensmitteln als auch als Duftstoff in Kosmetik Verwendung [Gardner *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2010]. Aus der daraus resultierenden kontinuierlichen Exposition des Menschen mit Methyleugenol und weiterer Phenylpropanoide können gesundheitliche Risiken nicht ausgeschlossen werden. Im Tierversuch wurden bereits mutagene und kanzerogene Wirkungen von Methyleugenol gezeigt, auf Grund derer Methyleugenol als gentoxisches Kanzerogen klassifiziert wurde [NTP, 2000; SCF, 2001]. Durch die biologische Metabolisierung von Methyleugenol mittels der Phase-I-Enzyme Cytochrom P450 Monooxygenasen werden zahlreiche oxidative Metaboliten gebildet, welche auf Grund ihrer Reaktionsfähigkeit mit der DNA und anderen Makromolekülen interagieren können und daher für eine toxikologische Bewertung von Methyleugenol eine wichtige Rolle spielen [Gardner *et al.*, 1997; Jeurissen *et al.*, 2006; Cartus *et al.*, 2012]. In vorherigen Studien wurde eine potente DNA-schädigende Wirkung von Methyleugenol und den oxidativen Metaboliten 1'-Hydroxymethyleugenol, Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol an V79 Zellen, eine Lungenfibroblasten-Zelllinie des männlichen chinesischen Hamsters, gezeigt [Groh *et al.*, 2012]. Ziel dieser Arbeit ist es, den Wirkmechanismus, der zur gentoxischen Wirkung von Methyleugenol und den drei ausgewählten oxidativen Metaboliten führt, zu charakterisieren, um im Rahmen einer Risikobewertung den Beitrag der Methyleugenolmetaboliten zur gentoxischen Wirkung der Muttersubstanz zu prüfen. Durch diese Auswahl an Testsubstanzen 1) 1'-Hydroxymethyleugenol als proximales Kanzerogen, 2) Methyleugenol-2',3'-epoxid als reaktives Epoxid und 3) 3'-Oxomethylisoeugenol als reaktive  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindung sollen Daten zum Struktur-Wirkmechanismus von oxidativen Metaboliten im Vergleich zur Muttersubstanz Methyleugenol generiert werden. Der Schwerpunkt bei der Aufklärung des Wirkmechanismus lag zum einen auf Untersuchungen zu direkt gentoxischen Wirkmechanismen, wie z.B. der Induktion von DNA-Strangbrüchen oder von Mikrokernen. Im Rahmen der Untersuchungen zur Beeinflussung der zellulären Signaltransduktion lag der Schwerpunkt auf DNA-Schaden-assoziierten Enzymen, wie die Klasse der Histondeacetylasen sowie der Topoisomerasen. Von

besonderem Interesse ist hierbei die Frage einer möglichen Stabilisierung des kovalenten DNA-Topoisomerase-Komplexes oder der direkten katalytischen Hemmung der Topoisomerase als potentielle gentoxische Wirkqualität. Als weitere nachgeschaltete zelluläre Zielstrukturen wurden DNA-Reparatur-assoziierte Enzyme wie ATM und ATR, die Zellzyklus „*Checkpoint*“-Kinasen Chk1 und Chk2, das Tumorsuppressorprotein p53 sowie BRCA1, ein wichtiges Protein des DNA-Reparatursystems, mit in die Arbeit einbezogen. Ebenso soll die Frage der Relevanz des Wirkmechanismus der Substanzen für die Integrität zellulärer DNA geklärt werden.

Der zweite Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Untersuchung zur Beeinflussung epigenetischer Faktoren durch Polyphenole. Während der Kanzerogenese werden wichtige Tumorsuppressorgene abgeschaltet bzw. Protoonkogene aktiviert. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass gerade hierbei epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierung und Histonmodifizierungen eine wichtige Rolle spielen. Die Modulation der Prozesse der Histonmodifizierung (Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung, SUMOylierung) durch Lebensmittelinhaltsstoffe wird als neuer Biomarker für das chemoprotektive Potential von Polyphenolen diskutiert [Hanahan und Weinberg, 2000; Link *et al.*, 2010]. Jedoch ist bislang unzureichend geklärt, ob diese Eingriffe in die DNA-Integrität auch negative Effekte aufweisen könnten.

SUMO („*small ubiquitin-like modifier*“)-Proteine gehören zur Familie der Ubiquitin-ähnlichen Proteine, die analog zum Ubiquitin über kovalente Bindungen mit zellulären Proteinen verknüpft werden [Sarge und Park-Sarge, 2009]. Das SUMO-System kontrolliert die Funktion einer Vielzahl an Proteinen. HDACs gehören zur Gruppe der SUMO-Substratproteine und sind auf Grund ihrer oftmals auftretenden Fehlregulation bzw. Überexpression in Tumorzellen von großem wissenschaftlichem Interesse [Shiio und Eisenman, 2003]. Es ist bislang wenig bekannt, ob Polyphenole die Aktivität zellulärer Proteine durch Beeinflussung der posttranslationalen Modifikation durch SUMO modulieren. Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob Polyphenole Einfluss auf die SUMO 1 Expression sowie die SUMO 1/HDAC 1-Interaktion nehmen und wie solche Effekte die HDAC-Aktivität beeinflussen.

## **4. Untersuchung der posttranslationalen Histondeacetylase-Modifizierung durch Polyphenole**

### **4.1 Ergebnisse**

#### **4.1.1 Etablierung eines geeigneten Zellmodells**

Zunächst musste ein geeignetes Zellmodell zur Messung der Expression von SUMO etabliert werden. Dazu wurde eine Western Blot Analyse mit dem monoklonalem Antikörper gegen SUMO E1, wobei auch die SUMO-Oligomere bei 34 kDa und 90 kDa detektierbar sind, durchgeführt. Es wurde weiter zwischen einer zytosolischen Fraktion und der Kernfraktion des Zelllysates unterschieden, um mögliche Effekte auf den Proteinstatus beider Fraktionen vergleichen zu können. Unter SUMO werden drei Formen E1, E2 und E3 zusammengefasst, die in der Konjugationreaktion des Zielproteins in der enzymatischen Kaskade eine Rolle spielen [Hay, 2005]. Als geeignetes Modell erwiesen sich HT29 Zellen, eine Kolon-Adenokarzinomzelllinie. SUMO Proteine bilden heteromere Strukturen aus. Das SUMO Monomer hat ein Molekulargewicht von 11,5 kDa. In HT29 Zellen konnten die SUMO Oligomere bei 34 kDa und 90 kDa detektiert werden (Abb.41).


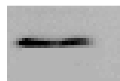
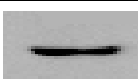
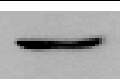


	<b>zytosolische Fraktion</b>	<b>Kernfraktion</b>
SUMO E1 90 kDa		
SUMO E1 34 kDa		
$\alpha$ -Tubulin		

Abb.41: Exemplarischer Western Blot zur Detektion von SUMO E1 in HT29 Zellen

#### **4.1.2 Beeinflussung der Zellviabilität der HT29 Zellen nach Inkubation mit ausgewählten Polyphenolen**

Die Zytotoxizität der drei Polyphenole Chlorogensäure, Genistein und EGCG wurde mit Hilfe des WST-1 ("*water soluble tetrazolium salt*") Tests nach 24-stündiger und 48-stündiger Inkubation untersucht. Die Zellinkubation mit den Polyphenolen wurde in Anwesenheit von Katalase (100 U/mL) durchgeführt, um einen Einfluss des unter Zellkulturbedingungen gebildeten Wasserstoffperoxids zu verhindern [Bellion *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2000; Suh *et al.*, 2010; Lopez-Lazaro *et al.*, 2011; Kern *et al.*, 2007]. Die Zytotoxizität der drei Polyphenole wurde untersucht, um den nicht-zytotoxischen Bereich für die nachfolgenden Untersuchungen festzulegen. Chlorogensäure zeigte bis zu einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  in beiden Inkubationszeitpunkten keine zytotoxischen Eigenschaften in HT29 Zellen. Ebenso konnte weder nach 24-stündiger noch nach 48-stündiger Inkubation mit 200  $\mu\text{M}$  Genistein ein zytotoxischer Effekt nachgewiesen werden. Auch EGCG zeigte in der höchsten getesteten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden keine Beeinträchtigung der Zellvitalität [Daten nicht gezeigt; Untersuchung durchgeführt von Frau Lüske; Forschungspraktikum 2011 in der AG Junprof. Dr. Esselen].

### **4.1.3 Beeinflussung der SUMO E1 Expression nach Inkubation mit Polyphenolen**

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Testung der Beeinflussung der SUMO E1 Expression durch die drei Polyphenole dargestellt.

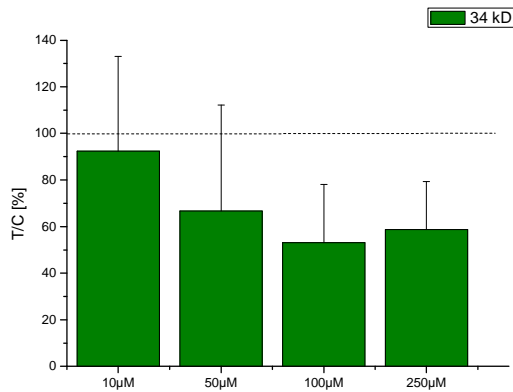
Es wurde zunächst ein Zeitversuch durchgeführt, in dem HT29 Zellen für eine Stunde, drei Stunden, sechs Stunden, zwölf Stunden und 24 Stunden mit dem entsprechenden Polyphenol inkubiert wurden. Als geeignetes Zeitfenster hat sich die 24-stündige Inkubation herausgestellt.

Nach 24-stündiger Inkubation der HT29 Zellen mit Chlorogensäure zeigte sich im Konzentrationsbereich von 10 – 250  $\mu\text{M}$  ein marginalen Rückgang der SUMO E1 Expression in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5%) sowohl in der Kernfraktion als auch in der zytosolischen Fraktion (Abb.42). In der zytosolischen Zellfraktion wurde keine Bande von 90 kDa detektiert. Es ist jedoch in beiden Zellkompartimenten (Zytosol und Kern) eine Dosis-Wirkungsbeziehung erkennbar. Ein Signifikanzniveau wird jedoch nicht erreicht.

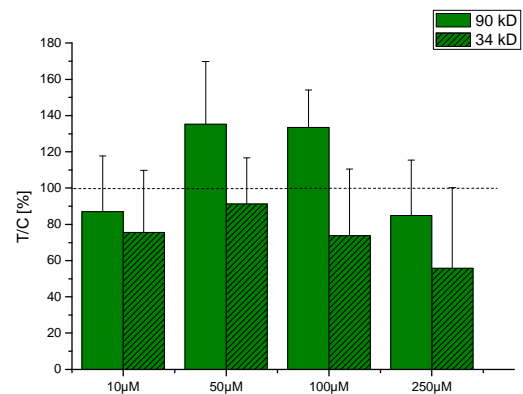


Chlorogensäure

## a) zytosolische Fraktion



## b) Kernfraktion



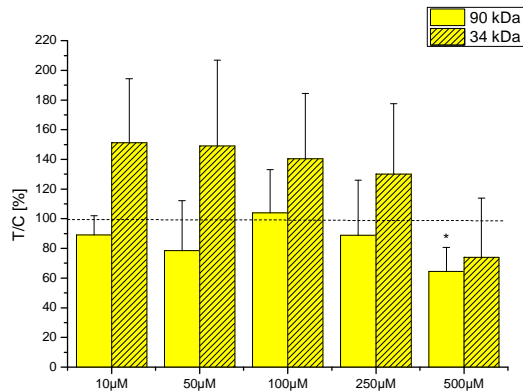
c)

	zytosolische Fraktion					Kernfraktion				
	Chlorogensäure					Chlorogensäure				
Konzentration [µM]	DMSO	10	50	100	250	DMSO	10	50	100	250
SUMO E1 90 kDa										
SUMO E1 34 kDa										
α-Tubulin 56 kDa										

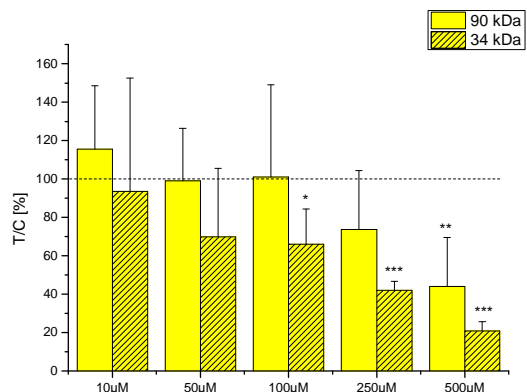
Abb.42: a) Graphische Darstellung der SUMO E1 Expression in der a) Kernfraktion und b) zytosolischen Fraktion von HT29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Chlorogensäure (10 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM) bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5 %) (n=4). c) Exemplarischer Western Blot der Expression von SUMO in der Kernfraktion und der zytosolischen Fraktion nach 24-stündiger Inkubation mit Chlorogensäure.

Genistein:

## a) Zytosolische Fraktion



## b) Kernfraktion



## c)

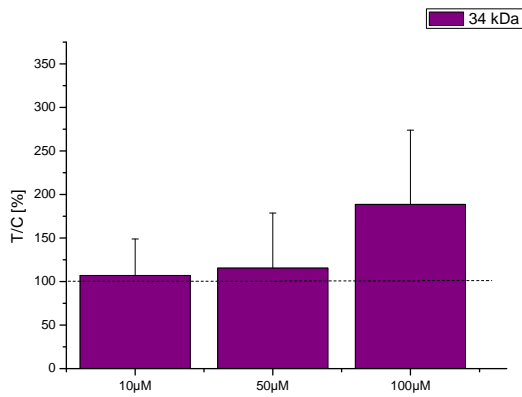
	zytosolische Fraktion						Kernfraktion					
	Genistein						Genistein					
Konzentration [μM]	D	10	50	100	250	500	D	10	50	100	250	500
SUMO E1 90 kDa												
SUMO E1 34 kDa												
α-Tubulin 56 kDa												

Abb.43: a) Graphische Darstellung der SUMO E1 Expression in der a) Kernfraktion und b) zytosolischen Fraktion von HT29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Genistein (10 μM, 50 μM, 100 μM, 250 μM, 500 μM) bezogen auf die Negativkontrolle DMSO (0,5 %) (n=4). \* Signifikanz zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO; 0,5%), Student's *t* Test \*:  $t = 0,05$ ; \*\*:  $t = 0,01$ ; \*\*\*:  $t = 0,005$ . c) Exemplarischer Western Blot der Expression von SUMO in der Kernfraktion und der zytosolischen Fraktion nach 24-stündiger Inkubation mit Genistein.

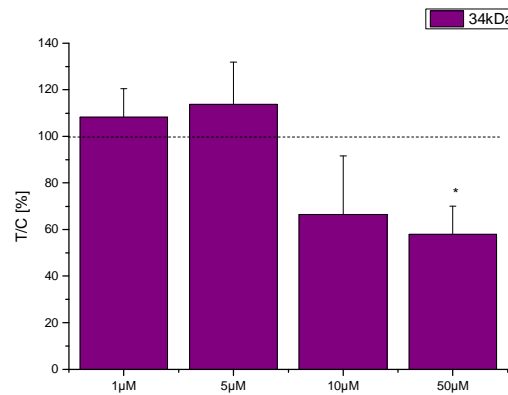
Eine deutliche Hemmung der SUMO E1 Expression zeigte sich nach der Inkubation von HT29 Zellen mit Genistein sowohl in der Kernfraktion als auch in der zytosolischen Fraktion. In beiden Fraktionen konnten die beiden SUMO-Oligomere nachgewiesen werden. So wurde durch die Inkubation mit Genistein ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  in der Kernfraktion ein signifikanter Rückgang der SUMO Expression des Oligomers (34 kDa) detektiert (Abb.43). In der höchsten gemessenen Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  ist der Rückgang der Expression für beide SUMO-Oligomere (34 kDa und 90 kDa) signifikant. In der zytosolischen Fraktion wurde in der höchsten gemessenen Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  nur bei dem 90 kDa SUMO-Oligomer eine signifikante Verminderung der SUMO-Expression ermittelt. Insgesamt zeigte sich eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der SUMO E1 Expression im Zytosol sowie im Zellkern durch die 24-stündige Inkubation mit Genestein.

EGCG:

## a) zytosolische Fraktion



## b) Kernfraktion



## c)

	zytosolische Fraktion				Kernfraktion				
	EGCG				EGCG				
Konzentration [µM]	DMSO	10	50	100	DMSO	1	5	10	50
SUMO E1 34 kDa*									
α-Tubulin 56 kDa									

Abb.44: a) Graphische Darstellung der SUMO E1 Expression in der a) Kernfraktion und b) zytosolischen Fraktion von HT29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit EGCG bezogen auf die Negativkontrolle DMSO (0,5 %) (n=4). \* Signifikanz zur Lösungsmittelkontrolle (DMSO; 0,5%), Student's *t* Test \*:  $t = 0,05$ . c) Exemplarischer Western Blot der Expression von SUMO in der Kernfraktion und der zytosolischen Fraktion nach 24-stündiger Inkubation mit EGCG.

Sowohl in der zytosolischen als auch in der Kernfraktion konnte nach Inkubation von HT 29 Zellen mit EGCG nur ein SUMO-Oligomer mit einem Molekulargewicht von 34 kDa detektiert werden.

Die nukleare SUMO-Expression wurde durch 50 µM EGCG signifikant gehemmt, wohingegen es in der zytosolischen Fraktion durch EGCG zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der SUMO-Expression kam (Abb.44).

Die beiden Polyphenole EGCG und Genistein zeigten eine Beeinflussung des SUMO E1 Proteinstatus. Chlorogensäure zeigte hingegen keinen Effekt auf die SUMO E1 Expression. Die Beeinflussung des Proteinstatus von SUMO E1 kann möglicherweise bei der SUMOylierung der Zielproteine eine Rolle spielen, da SUMO E1 für die Konjugationsreaktion des Zielproteins in der enzymatischen Kaskade wichtig ist [Hay, 2005]. Als mögliches Zielprotein von SUMO wird in dieser Arbeit die Histondeacetylase nach Inkubation mit den ausgewählten Polyphenolen näher untersucht.

#### 4.1.4 Modulation der HDAC-Aktivität in HT29 Zellen

In einer weiteren Untersuchung wurde die Modulation der HDAC-Aktivität in HT29 Zellen betrachtet (Abb.45). Hierzu wurden die HT29 Zellen mit den Testsubstanzen inkubiert und die Enzymaktivität mit dem käuflichen HDAC zellbasierten Aktivitätsassay-Kit (Biomol) untersucht. Hierbei wird ein zellgängiges HDAC-Substrat (BOC-N<sup>ε</sup>-acetyl-L-lysin-7-amino-4-methylcoumarin) eingesetzt und die Fluoreszenz des deacetylierten Substrates fluorometrisch gemessen. Rekombinante HDAC wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Zur Absicherung der Spezifität des Testsystems wird der HDAC-Hemmstoff Trichostatin A (TA) verwendet.

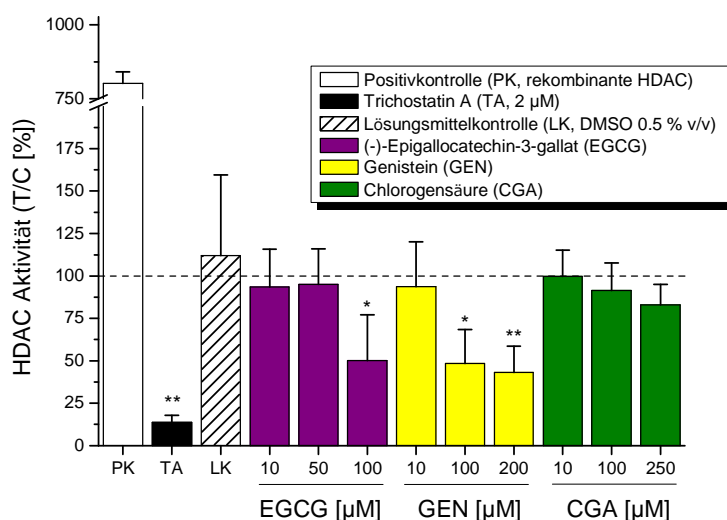


Abb.45: Beeinflussung der HDAC1 Aktivität in HT29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit den Polyphenolen EGCG, Genistein und Chlorogensäure in Anwesenheit von Katalase (100 U/mL). Die HDAC-Aktivität wurde durch die Umsetzung des spezifischen HDAC 1 Substrates (Boc-Lys(AC)-AMC) bestimmt. Rekombinante HDAC 1 wurde als Positivkontrolle (PK) und Trichostatin A (TA) als ein spezifischer HDAC-Inhibitor eingesetzt. Die hier gezeigten Daten sind MW  $\pm$  STABW von n = 3 als Duplikat. Die Signifikanzen wurden in Relation zur Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,5% v/v berechnet (Student's *t* Test: \* = *p* < 0,05; \*\* = *p* < 0,01).

EGCG und Genistein zeigten inhibitorische Effekte auf die zelluläre HDAC 1 Aktivität in einer dosisabhängigen Beziehung (Abb.45). Das Sojaisoflavon Genistein hemmte die Enzymaktivität mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 97  $\pm$  18 µM. Das Grüntee catechin EGCG hemmte die HDAC-Aktivität über 50 % in einer Konzentration von 100 µM. Im Gegensatz zeigte Chlorogensäure keine Hemmeffekte auf die zelluläre HDAC-Aktivität in HT29 Zellen in Konzentrationen bis 250 µM.

#### 4.1.5 Beeinflussung der HDAC 1 Expression nach Inkubation mit den ausgewählten Polyphenolen

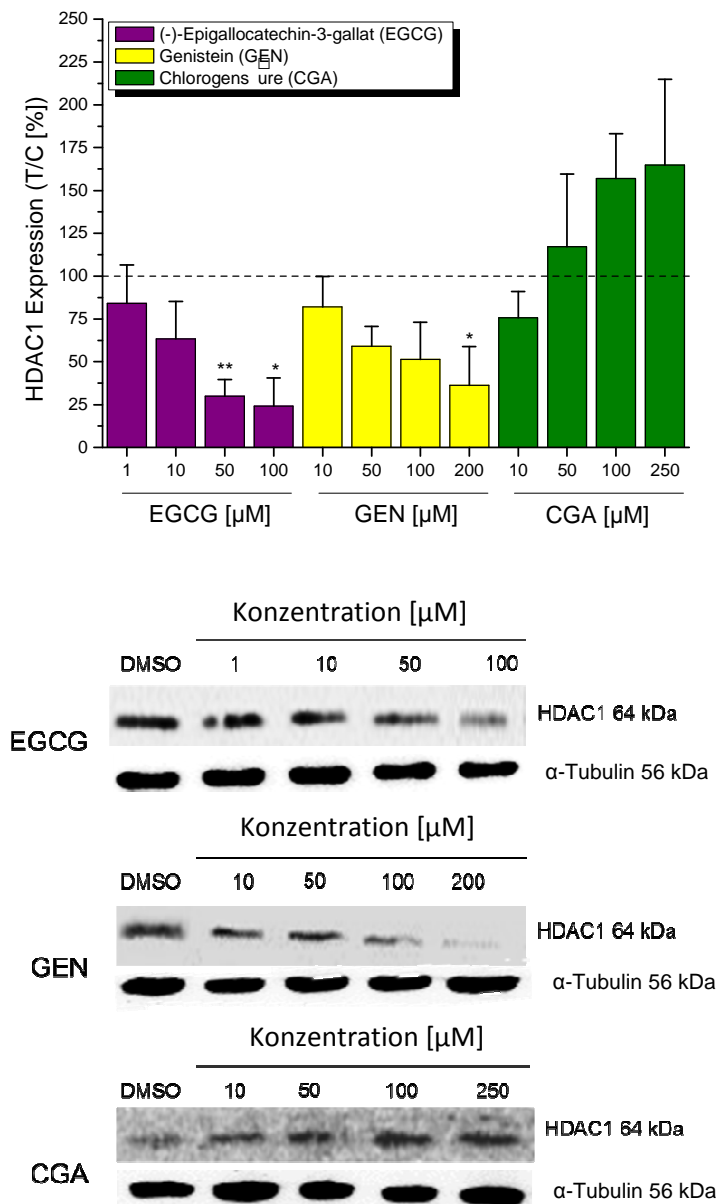


Abb.46: Western Blot Analyse und repräsentative Western Blots der HDAC 1 Expression in HT29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit den ausgewählten Polyphenolen in Anwesenheit von Katalase (100 U/mL). DMSO; Lösungsmittelkontrolle (0,5% v/v),  $\alpha$ -Tubulin; Ladungskontrolle. Arbitrary Light Units wurden als Test over Control [%] geblottet, mit der Lösungsmittelkontrolle (0,5% v/v DMSO) als 100 % gesetzt. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von vier unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzen wurden in Relation zur niedrigsten Konzentration berechnet (Student's *t* Test: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ).

Der Einfluss von den Testsubstanzen auf den HDAC 1 Proteinstatus in HT29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation wurde mittels Western Blot Analyse mit dem spezifischen polykononalen Antikörper gegen humane HDAC 1 untersucht. Die Inkubation mit Chlorogensäure führte zu einem Anstieg des HDAC 1 Proteinstatus in Konzentrationen bis 250  $\mu\text{M}$  ohne statistische Relevanz (Abb.46). Im Gegensatz dazu führte die Inkubation mit Genistein in Konzentrationen bis 200  $\mu\text{M}$  zu einer Reduzierung der HDAC 1 Proteinmenge. Ebenso zeigte EGCG einen hemmenden Effekt auf die HDAC 1 Expression. Der HDAC 1 Proteinstatus wurde in Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$  signifikant verringert.

Sowohl EGCG als auch Genistein zeigten einen Hemmeffekt auf die HDAC-Aktivität und HDAC 1 Expression. Hingegen zeigte Chlorogensäure keinen Einfluss auf die HDAC-Aktivität. Nach Inkubation mit Chlorogensäure wurde ein Anstieg des HDAC 1 Proteinstatus detektiert, jedoch wurde kein Signifikanzniveau erreicht.

Da die beiden Polyphenole EGCG und Genistein einen Einfluss auf HDAC zeigten, wird im Folgenden eine mögliche Interaktion zwischen HDAC und SUMO nach Inkubation mit den Polyphenolen untersucht. HDACs wurden bereits in der Literatur als mögliche Zielproteine für SUMO beschrieben [Brandl *et al.*, 2012; Shio und Eisenman, 2003; David *et al.*, 2002; Chiocca und Seiser, 2012]. Eine Interaktion mit SUMO könnte dabei möglicherweise die detektierten Effekte auf die HDAC-Aktivität und HDAC 1 Expression nach Inkubation mit den ausgewählten Polyphenolen begründen.

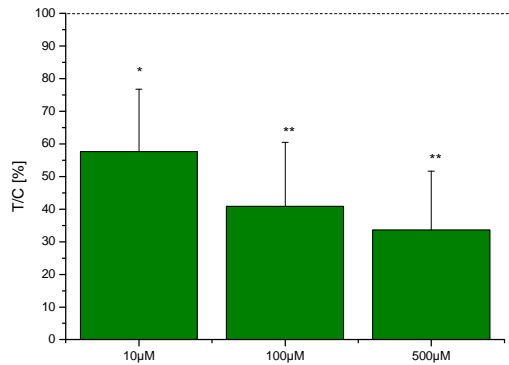


#### 4.1.6 Einfluss der Polyphenole auf die direkte Substrat-Konjugation

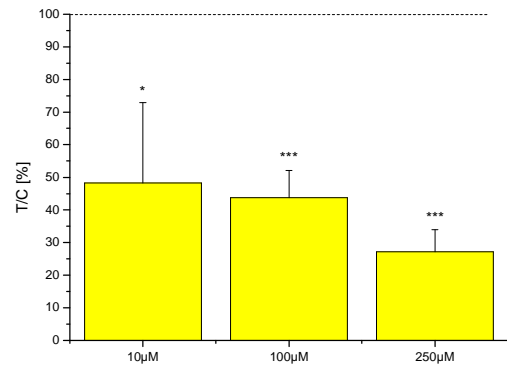
Um eine mögliche Interaktion zwischen SUMO E1 und HDAC 1 nach Inkubation mit den Testsubstanzen zu untersuchen, wurde eine (Co-)Immunpräzipitation durchgeführt. Bei der Immunpräzipitation wird ein spezifisches Protein aus einem Proteingemisch/Zelllysate präzipitiert. Dazu wurden die Zellen ausgesät und für 24 Stunden mit den ausgewählten Polyphenolen inkubiert. Nach der Zelllyse erfolgte die Bindung an den spezifischen Antikörper gegen SUMO E1, welcher wiederum mit dem Fc-Teil an Protein-G Sepharose gebunden wird. Protein-G ist über eine Sepharose Matrix immobilisiert; dadurch kann das Immunpräzipitat durch Zentrifugation der Protein-G Matrix gewonnen und angereichert werden. Wenn zudem Interaktionspartner (in diesem Fall HDAC 1) des untersuchten Proteins binden, so handelt es sich um eine Co-Immunpräzipitation. Es erfolgte der Nachweis mittels Western Blot Analyse mit dem spezifischen Antikörper gegen HDAC 1. In den folgenden Schaubildern sind die Ergebnisse der Co-Immunpräzipitation zur Interaktion zwischen HDAC 1 und SUMO E1 nach 24-stündiger Inkubation an HT29 Zellen mit dem jeweiligen Polyphenol zusammengefasst (Abb.48). Neben der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,5%) wurde der Puffer mit Antikörper (P) und das Zelllysate ohne Antikörper (Z) mitgeführt. Nach 24-stündiger Inkubation der HT29 Zellen mit Chlorogensäure, EGCG und Genistein ist ein dosisabhängiger Rückgang der Substrat-Konjugation zwischen HDAC 1 und SUMO E1 zu erkennen. Das erste Signifikanzniveau nach Inkubation mit Chlorogensäure wird bereits in der niedrigsten getesteten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  detektiert (Abb.47a). In Konzentrationen  $\geq 100 \mu\text{M}$  sind die Substrat-Konjugationen signifikant gehemmt im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5%). Nach Inkubation mit Genistein zeigte sich ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine signifikante Hemmung der HDAC 1-SUMO E1 Interaktion (Abb. 47b). Bei der Beurteilung der Aussagekraft der Ergebnisse ist die Verminderung der Bandenintensität des IgE in der höchsten getesteten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Genistein im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu berücksichtigen. So kann in diesem Fall keine eindeutige Aussage zur Substrat-Konjugation getroffen werden. In Konzentrationen  $\geq 1 \mu\text{M}$  von EGCG konnte ein signifikanter Rückgang der Interaktion zwischen HDAC 1 und SUMO E1 vergleichend mit der Lösungsmittelkontrolle detektiert werden (Abb. 47c). Jedoch konnte auf

Grund der schwächeren Bandenintensität des IgE in der Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle keine Aussage zur Interaktion der Zielproteine getroffen werden.

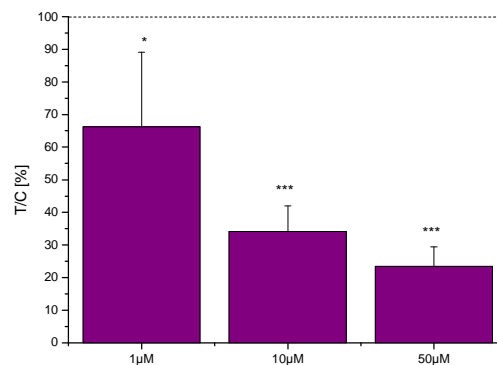
a) Chlorogensäure



b) Genistein



c) EGCG



d)

	Chlorogensäure				EGCG			Genistein							
	D	10	50	100	1	10	50	P	Z	D	D	10	50	100	
HDAC 1															
IgG															

Abb. 47: Einfluss von a) Chlorogensäure, b) Genistein c) EGCG nach 24-stündiger Inkubation auf die Expression von SUMO E1- HDAC 1- Komplexes nach Immunpräzipitation mit SUMO E1 Antikörper und Western Blot Analyse mittels Antikörper gegen HDAC 1; Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus 4 unabhängigen Versuchen, Student's *t* Test \*:  $t = 0,05$ ; \*\*:  $t = 0,01$ ; \*\*\*:  $t = 0,005$ . d) Repräsentativer Western Blot der Immunpräzipitate von Chlorogensäure, Genistein und EGCG, P = Puffer mit Antikörper; Z = Zelllysat ohne Antikörper; D = DMSO 0,5%.

## **4.2 Zusammenfassende Diskussion der posttranslationalen Histondeacetylase-Modifikation durch Polyphenole**

Es wurde berichtet, dass Polyphenole chemopräventive und krebstherapeutische Eigenschaften aufweisen [Duthie *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008]. Die positiven gesundheitlichen Eigenschaften der Polyphenole werden auf die Beeinflussung der Enzyme, die die Zellzyklusregulation, die Apoptose, Metastasierung und Angiogenese regulieren, zurückgeführt. Weiter wurde ein Effekt der Polyphenole auf die Genexpression durch posttranslationale Modifikationen wie DNA-Methylierung oder Histonacetylierung/- deacetylierung festgestellt [Rajendran *et al.*, 2011; Pandey *et al.*, 2010; Nandakumar *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2012].

Zunächst wurden in dieser Arbeit zytotoxische Effekte der ausgewählten Polyphenole mittels WST-1 Test untersucht. In der Literatur wurden bereits zytotoxische Wirkungen von Polyphenolen in dem verwendeten Konzentrationsbereich diskutiert [Kern *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Qi *et al.*, 2011]. Einige Studien zeigten, dass unter Zellkultur-Bedingungen gebildetes Wasserstoffperoxid, welches bei einer Reaktion der Polyphenole mit bisher unbekannten Bestandteilen des Kulturmediums entsteht, die Zellviabilität beeinflusst [Kern *et al.*, 2007; Bellion *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2000; Suh *et al.*, 2010; Long *et al.*, 2007; Lopez-Lazaro *et al.*, 2011]. EGCG zeigte ohne Zugabe von Katalase deutlich zytotoxische Effekte [Kern *et al.*, 2005; Lopez-Lazaro *et al.*, 2011]. Jedoch mit Zugabe von Katalase verringerten sich die zytotoxischen Eigenschaften von EGCG in Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$ , so dass ein Zusammenhang zwischen der Bildung von Wasserstoffperoxid und der Zytotoxizität vermutet werden kann. Auch Chlorogensäure (72-stündige Inkubation) zeigte ohne Anwesenheit von Katalase zytotoxische Eigenschaften mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von  $205 \pm 53 \mu\text{M}$  [Kern *et al.*, 2005]. Jedoch konnte in dieser Arbeit keine Zytotoxizität an HT29 Zellen nach Inkubation von Chlorogensäure (24 und 48 Stunden) mit dem Zusatz an Katalase in Konzentrationen bis 250  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden. Ebenso zeigte Genistein mit Zusatz von Katalase keine zytotoxischen Effekte in Konzentrationen  $\leq 200 \mu\text{M}$ . Im Gegensatz hierzu berichtet Yu *et al.* von einem dosisabhängigen (bis 100  $\mu\text{M}$ ) Rückgang der Zellviabilität von HT29 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Genistein ohne Zugabe von Katalase [Yu *et al.*, 2004]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Verwendung von Katalase bei Inkubationen mit Polyphenolen *in vitro* notwendig ist, damit keine

Hemmeffekte durch die Bildung von Wasserstoffperoxid entstehen können. Nur durch die Zugabe von Katalase (100 U/mL) kann ein inhibitorischer Effekt, auch auf den HDAC 1 und SUMO E1 Proteinstatus sowie auf die HDAC-Aktivität ausgeschlossen werden.

Weiter wurde gezeigt, dass EGCG, ein Grüntee Catechin, die HDAC-Aktivität und den HDAC 1 Proteinstatus in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 nach 24-stündiger Inkubation signifikant hemmt. Grüntee polyphenole wurden bereits in der Literatur als Aktivitätsinhibitoren der HDAC (insbesondere der Klasse I HDACs HDAC 1 und HDAC 3) beschrieben, weiter sollen sie auch die mRNA Expression von HDAC 1 und die Proteinexpression der Klasse I HDACs in Prostatakrebszellen und Brustkrebszellen vermindern [Pandey *et al.*, 2010; Thakur *et al.*, 2012; Deb *et al.*, 2014; Saldanha *et al.*, 2014; Moseley *et al.*, 2013]. Hier zeigte EGCG in Konzentrationen von 5- 20  $\mu\text{M}$  eine dosis- und zeitabhängige Wirkung auf die Klasse I HDAC Expression [Thakur *et al.*, 2012]. Die Ergebnisse der Literatur stimmen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein; EGCG führte in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zu einem signifikanten Rückgang der HDAC 1 Expression in HT29 Zellen, während eine Hemmung der HDAC-Aktivität erst ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  EGCG beobachtet werden konnte. Das Soja Isoflavon Genistein hemmte signifikant die HDAC-Aktivität; es wurde ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $97 \pm 18 \mu\text{M}$  berechnet. Die HDAC 1 Proteinexpression wurde erst signifikant nach Inkubation in der Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  Genistein vermindert. Hier könnten andere HDAC-Isoformen durch Genistein beeinflusst werden und so die Reduktion der HDAC-Aktivität in niedrigen Konzentrationen begründet sein, was jedoch in weiterführenden Untersuchungen verifiziert werden müsste. Genistein und andere Isoflavone wurden bereits als HAT Aktivatoren und HDAC-Inhibitoren an Ösophagus-, Prostata-, Brust- und Nierentumorzelllinie beschrieben [Hong *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2005; Kikuno *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Majid *et al.*, 2009]. Die HDAC-Aktivität wurde von Chlorogensäure in Konzentrationen bis 250  $\mu\text{M}$  nur marginal gehemmt. Hingegen stieg der HDAC 1 Proteinstatus moderat an, jedoch ohne statische Relevanz. Die HDAC-Aktivität von HeLa Kernextrakten wurde durch Chlorogensäure gehemmt ( $\text{IC}_{50}$ -Wert von 375  $\mu\text{M}$ ) [Bora-Tatar *et al.*, 2009]. Bisher konnten jedoch in *in vitro* Studien keine Modulation der HDAC-Aktivität durch Chlorogensäure nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde auch die Beeinflussung der SUMO E1 Expression nach Inkubation mit diesen Polyphenolen untersucht. Das SUMO-Protein ist eines der am besten charakterisierten ubiquitin-ähnlichen Proteine, welches posttranslationale Modifikationen beeinflusst [Melchior *et al.*, 2000; Hay *et al.*, 2001; Johnson und Gupta, 2001]. Eine SUMOylierung reguliert die Protein-Protein-Interaktion und Lokalisation, führt zur Inhibierung der ubiquitin-vermittelten Protein-Degradation und führt weiter zur Erhöhung der transkriptionalen Aktivität [Shiio und Eisenman, 2003]. Die hier untersuchten Polyphenole zeigten eine Hemmung der SUMO E1 Expression. Nach 24-stündiger Inkubation mit Chlorogensäure konnte nur ein marginaler Rückgang der SUMO E1 Expression detektiert werden. Nach Inkubation der HT29 Zellen mit Genistein wurde eine signifikante Hemmung des SUMO E1 Proteinstatus in Konzentrationen  $\geq 100 \mu\text{M}$  nachgewiesen. Auch EGCG zeigte einen signifikanten Rückgang der SUMO E1 Expression in Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$ . In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass HDACs als SUMO-Substratproteine dienen und dies mit transkriptionaler Repression und Apoptose zusammenhängt [Brandl *et al.*, 2012; Shiio und Eisenman, 2003; David *et al.*, 2002; Chiocca und Seiser, 2012]. Auch in dieser Arbeit wurde die Interaktion mit HDAC 1 und SUMO E1 mit Hilfe einer Immunpräzipitation untersucht. Dabei zeigte sich bei den drei untersuchten Polyphenolen ein Rückgang der Protein-Protein-Interaktion. Nach Inkubation mit Genistein und EGCG wurde sowohl ein Rückgang der SUMO E1 Expression als auch der HDAC 1 Expression gemessen; dies könnte damit auch die dosisabhängige Verminderung der HDAC 1- SUMO E1 -Interaktion begründen. Chlorogensäure hingegen zeigte einen marginalen Rückgang des SUMO 1 Proteinstatus, jedoch eine nicht signifikante Zunahme der HDAC 1 Expression. Wie auch bei Genistein und EGCG konnte hier ebenso ein signifikanter Rückgang der HDAC-SUMO-Interaktion nachgewiesen werden. In einer Studie von David *et al.* wurde berichtet, dass HDAC 1 an Lysin 444 und 476 SUMOyliert vorliegen kann [David *et al.*, 2002]. Diese SUMOylierung steht in Konkurrenz zur Ubiquitylierung, welche eine proteasomale Degradation zur Folge hat [Kovacs *et al.*, 2005]. Geht nun die SUMOylierung der HDAC 1 zurück, könnte die Ubiquitylierung des Enzyms zunehmen und damit Signalwege verändern, was wiederum die posttranslationale Modifikation und die Proteindegeneration beeinflusst [David *et al.*, 2002]. Wenn die SUMOylierte HDAC 1 abnimmt, so kann vermehrt Ubiquitin binden. Dies würde dazu führen, dass mehr HDAC 1 abgebaut wird, was auch ein Rückgang der HDAC

Aktivität zur Folge hätte. Diese Schlussfolgerung geht einher mit den Ergebnissen dieser Arbeit. So wurde eine Verminderung der HDAC 1- SUMO E1-Interaktion nach Inkubation mit EGCG und Genistein detektiert und folglich konnte ein Rückgang der HDAC-Aktivität nachgewiesen werden. Zur Unterstützung dieser Hypothese sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig. So könnte eine Untersuchung der Ubiquitylierung der HDAC 1 nach Inkubation mit EGCG und Genistein einen weiteren Hinweis geben.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die drei untersuchten Polyphenole einen Einfluss auf die SUMO E1 Expression haben. Weiter konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Flavonoide die posttranslationale Modifikation der HDAC 1 modulieren und somit EGCG und Genistein Einfluss auf die HDAC-Aktivität und auf den HDAC 1 Proteinstatus in der intakten Kolonkarzinomzelllinie nehmen. Dies lässt vermuten, dass EGCG und Genistein epigenetische Signalwege, welche die Hypothese der chemopräventiven Eigenschaften der Polyphenole unterstützen, beeinflussen.

## **5. Wirkmechanismen der Gentoxizität von Methyleugenol und ausgewählter oxidativer Metaboliten**

### **5.1 Untersuchungen der wachstumshemmenden Eigenschaften von Methyleugenol (ME) und oxidativer ME-Metaboliten**

Um wachstumshemmende Effekte bei den Untersuchungen der Gentoxizität ausschließen zu können, wurde zunächst die Beeinflussung des Wachstums von HT29 Zellen in Anwesenheit der Testsubstanzen mittels Sulforhodamin B (SRB) Test bestimmt. Dabei handelt es sich um einen photometrischen Assay, dessen Prinzip auf der Anfärbung des "Lebendproteins" mit dem Xanthenfarbstoff Sulforhodamin B beruht.

Es wurden die Konzentrationen (10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M und 100  $\mu$ M) untersucht, die in den anschließenden Testungen der Gentoxizität, der Interaktion mit Enzymen sowie der Untersuchung der Expression verschiedener Proteine verwendet werden sollten. Es wurden drei verschiedene Inkubationsintervalle von 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden gewählt. Zur Durchführung des SRB Tests wurden die HT29 Zellen in 24-Loch Mikrotiterplatten ausgestreut, mit den Substanzen für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert und die lebenden Zellen mit Trichloressigsäure fixiert. Danach wurden die fixierten Zellen mit SRB Reagenz für eine Stunde gefärbt und nach mehreren Waschschritten der Proteingehalt photometrisch ( $\lambda = 570$  nm) bestimmt.

Für Methyleugenol zeigten sich im vermessenen Konzentrationsbereich zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden und 72 Stunden keine zellwachstumshemmenden Effekte (Abb.48).

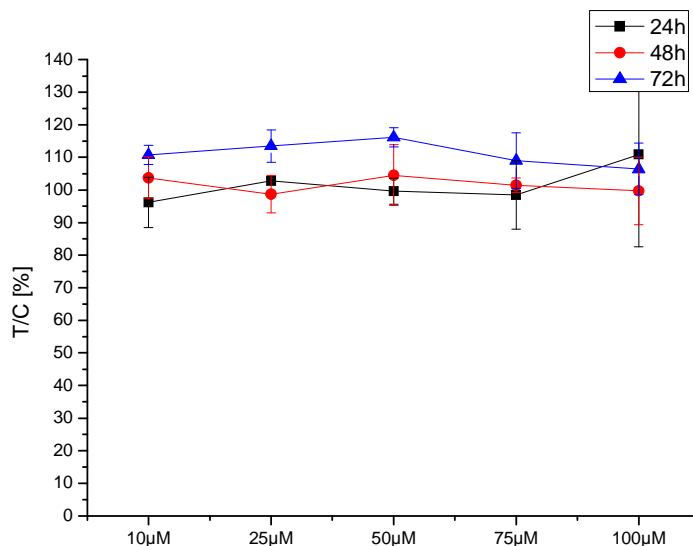


Abb.48: Einfluss von Methyleugenol auf die Zellwachstumshemmung von HT29 Zellen (SRB Test). Inkubation für 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden (0,5% DMSO, 10% FKS); abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung;  $n \geq 3$  in einer Vierfachbestimmung.



Auch der Hauptmetabolit 1'-Hydroxymethyleugenol ( $\leq 100 \mu\text{M}$ ) beeinflusste nicht das Zellwachstum im Zeitraum bis 72 Stunden (Abb.49).

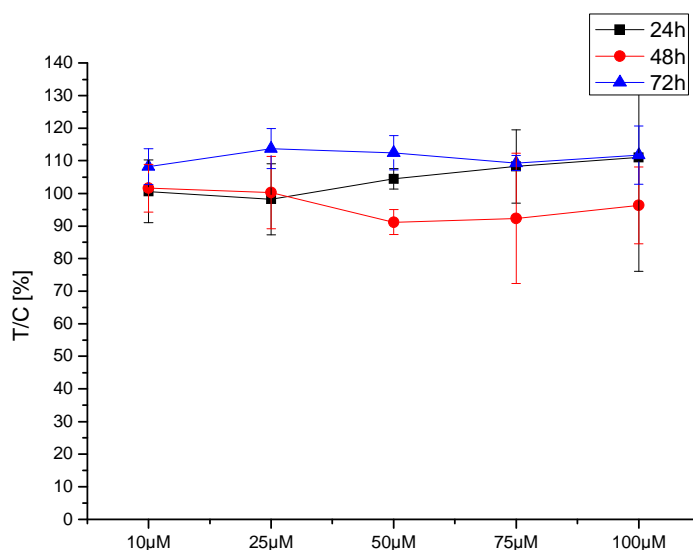


Abb.49: Einfluss von 1'-Hydroxymethyleugenol auf die Zellwachstumshemmung von HT29 Zellen (SRB Test). Inkubation für 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden (0,5% DMSO, 10% FKS); abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung;  $n \geq 3$  in einer Vierfachbestimmung.

Methyleugenol-2',3'-epoxid zeigte nach 24 Stunden Inkubation keine wachstumshemmende Effekte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (100%). Hingegen wurde nach 48-stündiger Inkubation eine signifikante Wachstumshemmung in der höchsten getesteten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  erfasst. Nach 72-stündiger Inkubation wurde ein signifikanter Rückgang des Zellwachstums in Konzentrationen  $\geq 75 \mu\text{M}$  beobachtet (Abb.50). Die Vitalität nach 48- und 72-stündiger Inkubation mit Methyleugenol-2',3'-epoxid 100  $\mu\text{M}$  betrug etwa 80% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (100%).

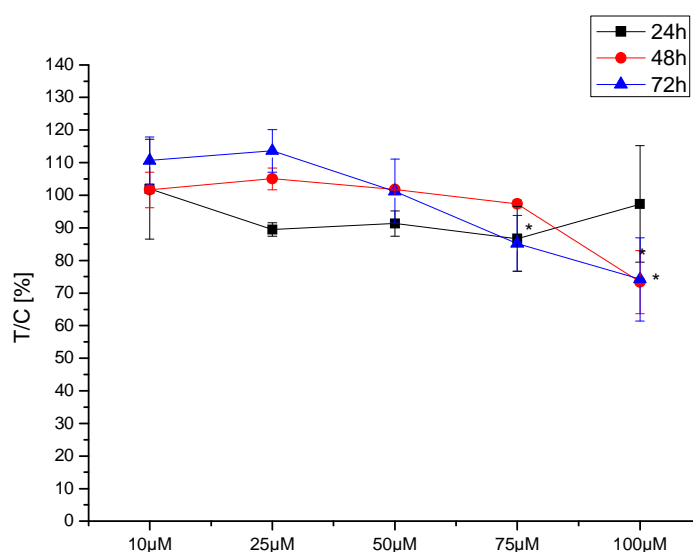


Abb.50: Einfluss von Methyleugenol-2',3'-epoxid auf die Zellwachstumshemmung von HT29 Zellen (SRB Test). Inkubation für 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden (0,5% DMSO, 10% FKS); abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung;  $n \geq 3$  in einer Vierfachbestimmung; \* signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle (0,5%) (Student's  $t$  test: \* =  $p < 0,05$ ).

Der dritte untersuchte oxidative Metabolit, 3'-Oxomethylisoeugenol erwies sich ebenfalls als wachstumshemmend auf HT29 Zellen. 3'-Oxomethylisoeugenol zeigte bereits nach 48-stündiger Inkubation in der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  signifikante wachstumshemmende Eigenschaften. Nach 72 Stunden Inkubation trat dieser Effekt schon ab einer Konzentrationen von 75  $\mu\text{M}$  auf. Nach 72-stündiger Inkubation mit 3'-Oxomethylisoeugenol (100  $\mu\text{M}$ ) sank die Vitalität der Zellen auf etwa 40% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (100%) ab (Abb.51). Für 3'-Oxomethylisoeugenol wurde nach 72-stündiger Inkubation ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $100,4 \pm 25,3 \mu\text{M}$  berechnet.

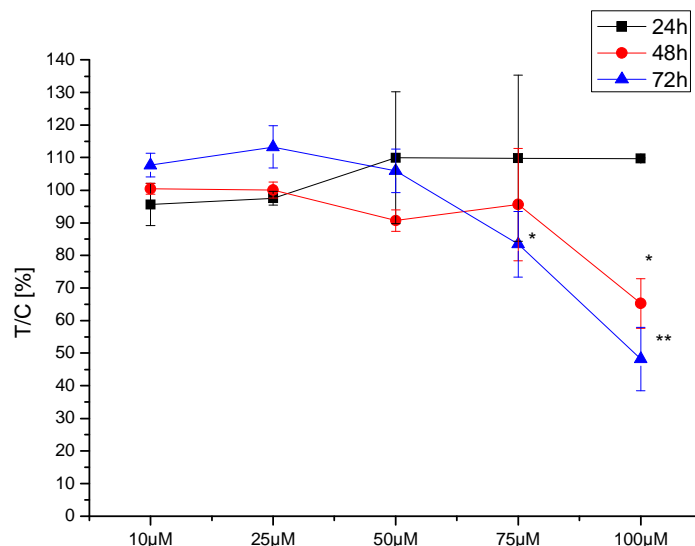


Abb.51: Einfluss von 3'-Oxomethylisoeugenol auf die Zellwachstumshemmung von HT29 Zellen (SRB Test). Inkubation für 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden (0,5% DMSO, 10% FKS); abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung;  $n \geq 3$  in einer Vierfachbestimmung; \* signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle (0,5%) (Student's t Test: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,001$ ).

Methyleugenol zeigte im SRB Test keinem der drei gewählten Inkubationszeitpunkten (24h, 48h, 72h) im Konzentrationsbereich bis 100  $\mu\text{M}$  wachstumshemmende Effekte auf HT29 Zellen. Auch im SRB Test an V79 Zellen konnte für Methyleugenol bis 100  $\mu\text{M}$  und den gleichen Inkubationszeiten bis 72 Stunden keine wachstumshemmenden Eigenschaften nachgewiesen werden [Groh *et al.*, 2012]. Ebenso konnte im WST-1 Test, ein Zytotoxizitätstest, keine zytotoxischen Effekte für Methyleugenol bis 100  $\mu\text{M}$  sowohl nach einstündiger als auch 24-stündiger Inkubation detektiert werden [Groh *et al.*, 2012]. Weitere Literaturdaten unterstützen dieses Ergebnis [Burkey *et al.*, 2000]. In der Studie von Burkey *et al.* wurde mittels LDH-Assay die Zytotoxizität nach 18 bis 20-stündiger Inkubation von Methyleugenol an isolierten Hepatozyten der Fischer 344 Ratten und B6C3F1 Mäusen untersucht. Methyleugenol bis 3000  $\mu\text{M}$  wies nur einen geringen zytotoxischen Effekt auf Hepatozyten der Ratte auf. Auch auf Maushepatozyten hatte Methyleugenol in Konzentrationen bis 1000  $\mu\text{M}$  nur geringe Wirkungen im Hinblick auf die Viabilität [Burkey *et al.*, 2000]. In der Studie von Cartus *et al.* wurde im LDH-Assay nach 24-stündiger Inkubation von primären Rattenhepatozyten erst in Konzentrationen  $\geq 2000$   $\mu\text{M}$  eine zytotoxische Wirkung von Methyleugenol festgestellt. Im Resazurin-Test an primären Rattenhepatozyten konnte ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $307 \pm 52$   $\mu\text{M}$  berechnet werden [Cartus *et al.*, 2012]. Die zytotoxischen Effekte an primären Rattenhepatozyten sind auf deren metabolische Ausstattung zurückzuführen, da sie Methyleugenol mit Hilfe von Cytochrom P450 (CYP450) Enzymen metabolisieren können. Primäre Zellen haben eine hohe CYP450 Aktivität gegenüber V79 Zellen (Lungenfibroblasten des männlichen chinesischen Hamsters), die keine CYP-Aktivität besitzen. Auch im Vergleich mit HT29 Zellen zeigen primäre Zellen eine höhere Enzymaktivität [Glatt *et al.*, 1990; Doehmer, 2009; Fogh, 1975; Bonnery *et al.*, 1974; Lin *et al.*, 1975; Guillouzo, 1998; Forster, 1986; Bourguine *et al.*, 2012].

Auch der Hauptmetabolit 1'-Hydroxymethyleugenol erwies sich in Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$  selbst nach der Langzeitinkubation von 72 Stunden als nicht wachstumshemmend auf HT29 Zellen. Ebenso verhielt sich der Hauptmetabolit im SRB Test an V79 Zellen. Auch hier zeigte er bis 100  $\mu\text{M}$  nach 72 Stunden wie die Muttersubstanz keinen Zellwachstumseffekt [Groh *et al.*, 2012]. Auch die Daten des WST-1 Tests an V79 Zellen stimmen mit diesen Daten überein; hier wurde sowohl nach einstündiger als auch nach 24-stündiger Inkubation kein zytotoxischer Effekt bis

zu einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  nachgewiesen [Groh *et al.*, 2012]. Hingegen zeigte sich der Hauptmetabolit in primären Rattenhepatozyten sowohl im LDH-Assay als auch im Resazurin-Test nach 24 Stunden als zytotoxisch mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von  $93 \pm 33 \mu\text{M}$  und  $46 \pm 14 \mu\text{M}$  [Cartus *et al.*, 2012]. Die zytotoxischen Effekte des Hauptmetaboliten an primären Rattenhepatozyten ist auf die Metabolisierung durch Sulfotransferasen zum reaktiven Carbokation, welches an Makromoleküle binden kann, zurückzuführen [Jeurissen *et al.*, 2006].

Nach 48-stündiger Inkubation mit Methyleugenol-2'-3'-epoxid wurde in der höchsten Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) ein signifikanter Rückgang des Zellwachstums beobachtet. Nach 72-stündiger Inkubation wurde dieser Effekt bereits ab einer Konzentration  $\geq 75 \mu\text{M}$  erfasst. Im SRB Test an V79 Zellen zeigte auch Methyleugenol-2',3'-epoxid nach 72-stündiger Inkubation zellwachstumshemmende Eigenschaften, hier wurde ein  $\text{IC}_{50}$  Wert von  $82 \pm 25 \mu\text{M}$  nach 72-stündiger Inkubation berechnet. Eine mögliche Erklärung für die geringer zytotoxischen Effekte des Epoxids an HT29 Zellen im Vergleich zu V79 Zellen könnte eine mögliche Entgiftung des Epoxids durch Epoxidhydrolasen in HT29 Zellen sein. Ebenso wurde im WST-1 Test an V79 Zellen ein signifikanter Rückgang der Zellviabilität sowohl nach einstündiger als auch 24-stündiger Inkubation in der höchsten Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) nachgewiesen [Groh *et al.*, 2012]. Methyleugenol-2',3'-epoxid zeigte nach 24-stündiger Inkubation an primären Rattenhepatozyten eine 50ig-prozentige Reduktion der Zellviabilität in Konzentrationen von 310  $\mu\text{M}$  (Resazurin-Test) [Cartus *et al.*, 2012]. Auf Grund der hohen metabolischen Aktivität der primären Zellen, kann es zu einer Entgiftung des Epoxids durch Epoxidhydrolasen kommen, was eine mögliche Erklärung für die geringere Zytotoxizität in diesem Testsystem im Vergleich zu HT29 Zellen und V79 Zellen darstellen kann.

Bei dem dritten untersuchten oxidativen Metabolit 3'-Oxomethylisoeugenol wurde nach 48-stündiger Inkubation ebenso in der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ein signifikanter Rückgang des Zellwachstums festgestellt. Eine signifikante Hemmwirkung wurde nach 72-stündiger Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  3'-Oxomethylisoeugenol erreicht; hier betrug der Lebendproteinanteil nur mehr etwa 40% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (100%); es wurde ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $100 \pm 25 \mu\text{M}$  berechnet. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen aus dem SRB Test und WST-1 Test an V79 Zellen überein, auch hier wurden für 3'-Oxomethylisoeugenol zellwachstumshemmende und zytotoxische Eigenschaften

festgestellt [Groh *et al.*, 2012]. Beim SRB Test an V79 Zellen wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert nach 72-stündiger Inkubation für 3'-Oxomethylisoeugenol von  $69 \pm 4 \mu\text{M}$  ermittelt. Das Ergebnis zeigt, dass V79 Zellen etwas sensitiver auf 3'-Oxomethylisoeugenol wirkt. Dies kann zum einen an der Zelllinie liegen oder an der fehlenden metabolischen Aktivität der V79 Zellen. V79 Zellen besitzen im Gegensatz zu HT29 Zellen weder Cytochrom P450 Monooxygenasen noch Sulfotransferasen [Glatt *et al.*, 1990; Doehmer, 2009; Fogh, 1975]. Dadurch ist keine Metabolisierung und Toxifizierung über die in der Literatur beschriebene Sulfotransferase-katalysierte Umsetzung zum Carbokation möglich. In primären Rattenhepatozyten zeigte sich 3'-Oxomethylisoeugenol nach 24-stündiger Inkubation als gering zytotoxisch. Es konnte im Resazurin-Test ein IC<sub>50</sub>-Wert von  $328 \pm 58 \mu\text{M}$  berechnet werden [Cartus *et al.*, 2012]. In Tab.11 sind die zytotoxischen Wirkungen der Testsubstanzen an verschiedenen Zelllinien und Testsystemen gegenübergestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwei der untersuchten oxidativen Metaboliten im Gegensatz zur Muttersubstanz wachstumshemmend auf HT29 Zellen wirken und somit in die Risikobewertung mit einzubeziehen sind. Die beiden Metabolite Methyleugenol-2'3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol zeigten in Konzentrationen  $\geq 100 \mu\text{M}$  wachstumshemmende Eigenschaften, die in der Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit berücksichtigt werden müssten. Da jedoch die Inkubationszeitpunkte in dieser Arbeit maximal 24 Stunden betragen, sind die zytotoxischen Effekte der Metabolite zu vernachlässigen.

Tab.11: Zytotoxische Wirkung von Methyleugenol und ausgewählten oxidativen Metaboliten

Substanz	Zelllinie	Testsystem	IC <sub>50</sub> - Wert [µM]			Metabol. Kompetenz	Literatur
			24 h	48h	72h		
ME	V79	SRB	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>b</sup>	Groh <i>et al.</i> , 2012
	HT29	SRB	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	+ <sup>c</sup>	
	pRH	LDH	> 2000			++ <sup>d</sup>	Cartus <i>et al.</i> , 2012
	pRH	Resazurin	307 ± 52			++ <sup>d</sup>	
1'-OH-ME	V79	SRB	- <sup>a</sup>	> 100	~ 100	- <sup>b</sup>	Groh <i>et al.</i> , 2012
	HT29	SRB	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	+ <sup>c</sup>	
	pRH	LDH	93 ± 33			++ <sup>d</sup>	Cartus <i>et al.</i> , 2012
	pRH	Resazurin	46 ± 14			++ <sup>d</sup>	
MEE	V79	SRB	> 100	83 ± 16	82 ± 25	- <sup>b</sup>	Groh <i>et al.</i> , 2012
	HT29	SRB	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	> 100	+	
	pRH	LDH	1342 ± 453			++ <sup>d</sup>	Cartus <i>et al.</i> , 2012
	pRH	Resazurin	310 ± 2,8			++ <sup>d</sup>	
3'-Oxo-MiE	V79	SRB	> 100	75 ± 9	69 ± 4	- <sup>b</sup>	Groh <i>et al.</i> , 2012
	HT29	SRB	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	100 ± 25	+ <sup>c</sup>	
	pRH	LDH	1478 ± 422			++ <sup>d</sup>	Cartus <i>et al.</i> , 2012
	pRH	Resazurin	328 ± 58			++ <sup>d</sup>	

-<sup>a</sup>: keine Hemmung bis 100 µM; -<sup>b</sup>:keine/geringe metabolische Aktivität [Glatt *et al.*, 1990; Doehmer, 2009]; +<sup>c</sup>: metabolisch aktiv [Fogh, 1975]; ++<sup>d</sup>: starke metabolische Aktivität [Forster, 1986]; pRH = primäre Rattenhepatozyten; LDH = Laktatdehydrogenase

## **5.2 Untersuchungen zur Gentoxizität**

Zur Bestimmung des gentoxischen Potentials von Methyleugenol und seinen oxidativen Metaboliten in HT29 Zellen wurde im Folgenden die Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay), die Hinweise auf Gentoxizität gibt, durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen für 24 Stunden mit den Testsubstanzen in den Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  inkubiert. Während der Untersuchung wurde ein Viabilitätstest mittels Trypanblau-Färbung durchgeführt, dabei lag die Zellviabilität in allen Versuchen über 80%. Als Referenzsubstanz wurde Menadion (20  $\mu\text{M}$ ) verwendet. Die Proben wurden zur Sicherstellung einer objektiven Auswertung codiert.

Methyleugenol erzeugte nach der 24-stündigen Inkubation in der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  signifikante DNA-Schäden in HT29 Zellen (Abb.52). Es ist ein Dosis-Wirkungsverlauf erkennbar. Die Lösungsmittelkontrolle zeigte eine Schweifintensität als Maß für die DNA-Strangbruchrate zwischen 1 - 2%, während sich in der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eine Schweifintensität von 6 - 8% ergab.



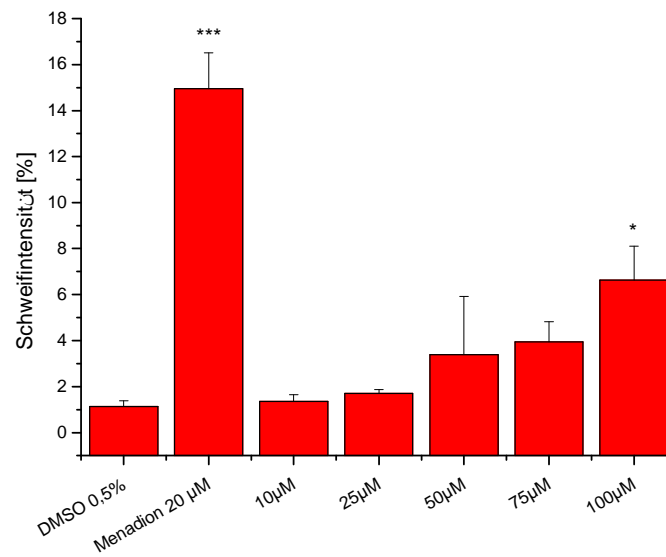


Abb.52: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Methyleugenol (10 µM, 25 µM, 50µM, 75 µM, 100 µM) nach Inkubation (0,5% DMSO, 10% FKS) von HT29 Zellen; abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; n = 3 in einer Doppelbestimmung; \* signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle (0,5%) (Student's *t*-Test \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Der Hauptmetabolit 1'-Hydroxymethyleugenol zeigte ein deutlich gentoxisches Potential (Abb.53). Hier trat die erste Signifikanz nach 24-stündiger Inkubation gegenüber der Lösungsmittelkontrolle in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  auf. Es ist eine typische Dosis-Wirkungskurve erkennbar. Die gemessene Schweifintensität lag zwischen sechs und elf Prozent (Abb.50).

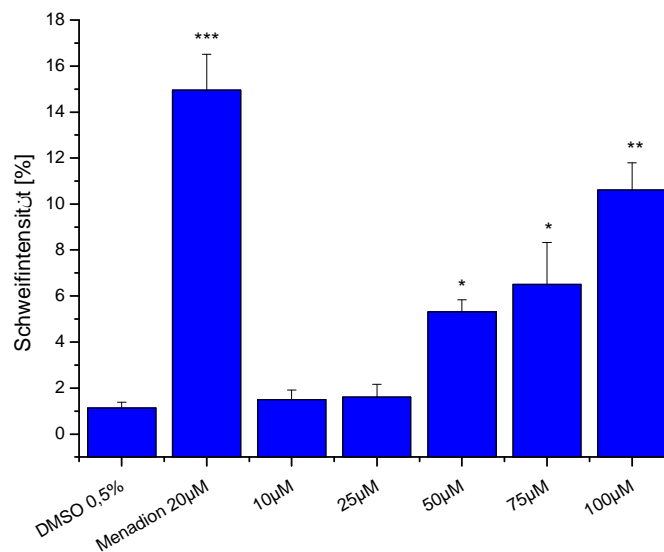


Abb.53: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch 1'-Hydroxymethyleugenol (10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) nach Inkubation (0,5% DMSO, 10% FKS) von HT29 Zellen; abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 3$  in einer Doppelbestimmung; \* signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle (0,5%) (Student's  $t$ -Test \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Methyleugenol-2',3'-epoxid zeigte ähnlich wie der Hauptmetabolit 1'-Hydroxymethyleugenol schon in sehr niedrigen Dosen signifikante DNA-strangbrechende Wirkungen (Abb.54).

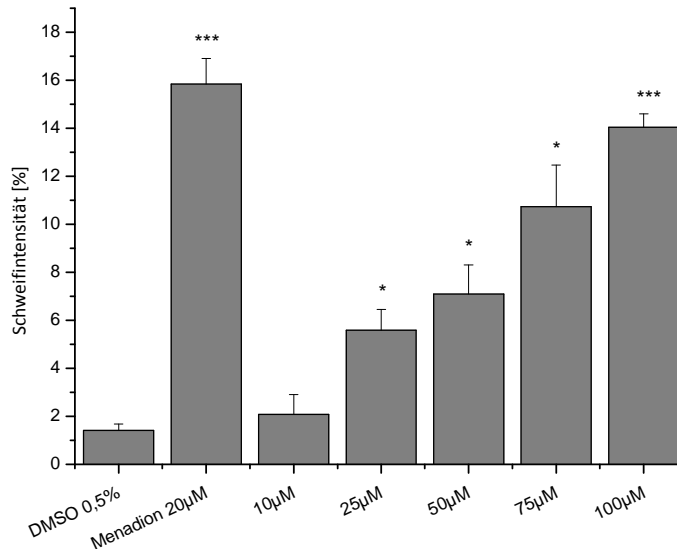


Abb.54: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Methyleugenol-2',3'-epoxid (10 µM, 25 µM, 50µM, 75 µM, 100 µM) nach Inkubation (0,5% DMSO, 10% FKS) von HT29 Zellen; abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; n = 3 in einer Doppelbestimmung; \* signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle (0,5%) (Student's *t*-Test \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Es konnte nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol-2',3'-epoxid ein Anstieg der DNA-strangbrechenden Wirkung bereits ab einer Konzentration  $\geq 25$  µM beobachtet werden. Die strangbrechende Wirkung von Methyleugenol-2',3'-epoxid entsprach in der höchsten getesteten Konzentration (100 µM) annähernd dem Niveau der Positivkontrolle Menadion (20 µM). Im Zuge der Einzelzellgelelektrophorese wurde jedoch nach der Inkubation ein Zellviabilitätstest mittels Trypanblau-Färbung durchgeführt. Hierbei lag die gemessene Viabilität der HT29 Zellen nach 24-stündiger Inkubation im gesamten Konzentrationsbereich über 80%.

3'-Oxomethylisoeugenol zeigte nach einstündiger Inkubation bis 100  $\mu\text{M}$  keine signifikante Zunahme an DNA-Schäden an HT29 Zellen (Abb.56). Erst nach 24-stündiger Inkubation bildet sich eine klassische Dosis-Wirkungsbeziehung aus. 3'-Oxomethylisoeugenol induzierte signifikant in Konzentrationen  $\geq 25$   $\mu\text{M}$  DNA-Strangbrüche in HT29 Zellen (Abb.55).

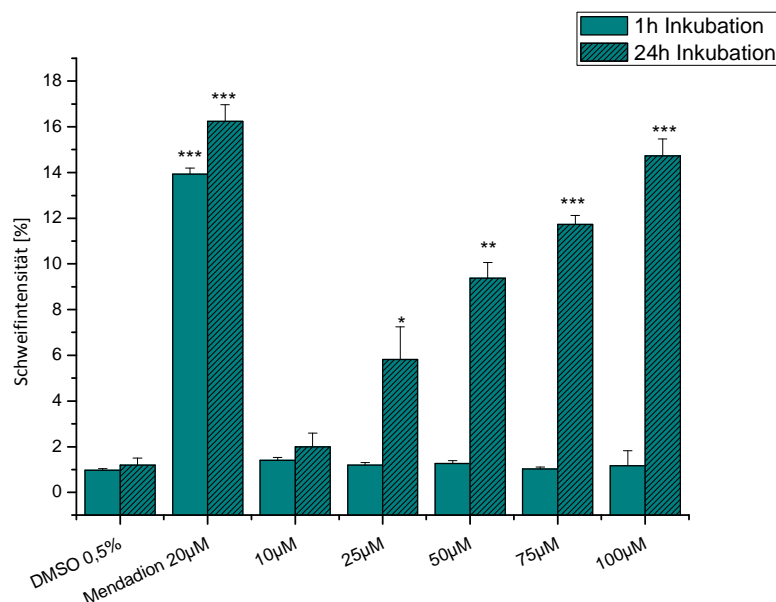


Abb.55: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch 3'-Oxomethylisoeugenol (10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) nach einstündiger und 24-stündiger Inkubation (0,5% DMSO, 10% FKS) von HT29 Zellen; abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 3$  in einer Doppelbestimmung; \* signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle (0,5%) (Student's  $t$ -Test \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Methyleugenol, 1'-Hydroxymethyleugenol und Methyleugenol-2',3'-epoxid zeigten an V79 Zellen bereits nach einstündiger Inkubation DNA-strangbrechende Wirkungen [Groh *et al.*, 2012]. Die im Gegensatz zu den anderen Testsubstanzen verzögerte Wirkung von 3'-Oxomethylisoeugenol (erst nach 24-stündiger Inkubation) wäre durch folgende Theorien möglicherweise zu begründen: Zum einen könnte 3'-Oxomethylisoeugenol zerfallen oder der Metabolit wird weitermetabolisiert zu einem DNA-strangbrechenden Produkt. Eine andere These könnte die zeitverzögerte Aufnahme von 3'-Oxomethylisoeugenol in die Zelle darstellen.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde von Frau Vallicotti an V79 Zellen in einer Forschungsarbeit Stabilitätsuntersuchungen zu 3'-Oxomethylisoeugenol durchgeführt [Vallicotti, Forschungsarbeit 2012 in der AG Junprof. Dr. Esselen; unveröffentlichte Daten]. Hierbei wurde das Verhalten von 3'-Oxomethylisoeugenol in Anwesenheit von V79 Zellen im Kulturmedium untersucht. Die Zellen wurden für null Stunden, eine Stunde und 24 Stunden mit 3'-Oxomethylisoeugenol inkubiert. Anschließend der Mediumüberstand abgenommen und mittels HPLC/UV ("*high-performance liquid chromatography*"; Ultraviolett) untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass es zwischen der einstündigen und 24-stündigen Inkubation zur vollständigen Umsetzung von 3'-Oxomethylisoeugenol kommt. Es zeigten sich anhand der UV-Spektren erste Hinweise, dass ein weiterer Metabolit 3'-Hydroxymethylisoeugenol gebildet wird. Diese Stabilitätsuntersuchung wurde auf Grund der verzögerten Wirkung von 3'-Oxomethylisoeugenol in der Einzelzellgelelektrophorese an HT29 Zellen wiederholt. Auch hier wurden die HT29 Zellen für null Stunden, eine Stunde und 24 Stunden mit 3'-Oxomethylisoeugenol inkubiert. Auch 3'-Hydroxymethylisoeugenol wurde bei der Untersuchung mitgeführt, um die einstündige Stabilität dieser Substanz nachzuweisen und als Referenzsubstanz zum gebildeten Intermediat. Es zeigte sich ein Signal zur gleichen Retentionszeit bei der 24-stündigen Inkubation mit 3'-Oxomethylisoeugenol als auch nach null Stunden bzw. einstündiger Inkubation mit 3'-Hydroxymethylisoeugenol an HT29 Zellen. Auch hier zeigten sich Hinweise anhand der UV-Spektren, dass 3'-Hydroxymethylisoeugenol gebildet wird (Abb. 56). Jedoch steht eine Quantifizierung mittels Massenspektrometer (MS) noch aus.

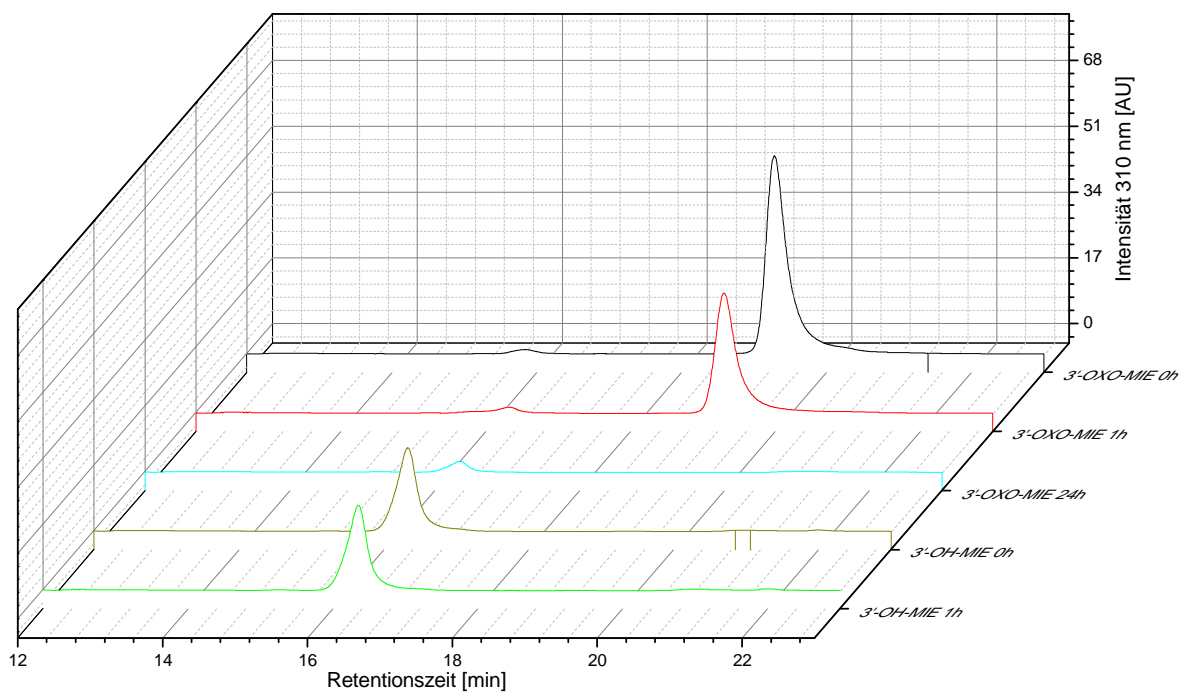


Abb.56: Chromatogramm mittels HPLC von 3'-Oxomethylisoeugenol und 3'-Hydroxymethylisoeugenol nach 0h, 1h und 24 h Inkubation an HT29 Zellen; Detektion bei Wellenlänge  $\lambda = 310 \text{ nm}$  und  $\lambda = 340 \text{ nm}$ .

3'-Hydroxymethylisoeugenol zeigte im Comet Assay nach einstündiger Inkubation eine DNA-strangbrechende Wirkung (Abb.57). 3'-Oxomethylisoeugenol hingegen zeigte erst nach 24-stündiger Inkubation ein DNA-strangbrechendes Potential. Auf diese Weise könnte nun erklärt werden, dass von dem 3'-Oxomethylisoeugenol keine DNA-strangbrechende Wirkung ausgeht, jedoch von dem gebildeten Metabolit 3'-Hydroxymethyleugenol. So zeigte 3'-Hydroxymethylisoeugenol nach einstündiger Inkubation ähnlich wie 3'-Oxomethylisoeugenol nach 24-stündiger Inkubation ab einer Konzentration  $\geq 25 \mu\text{M}$  ein signifikantes DNA-strangbrechendes Potential. So könnte eine Alkoholdehydrogenase-katalysierte Reaktion vom Aldehyd zum Alkohol in den Zellen stattfinden. HT29 Zellen exprimieren Alkoholdehydrogenasen, was diese Hypothese bestätigt [Bourguine *et al.*, 2012].

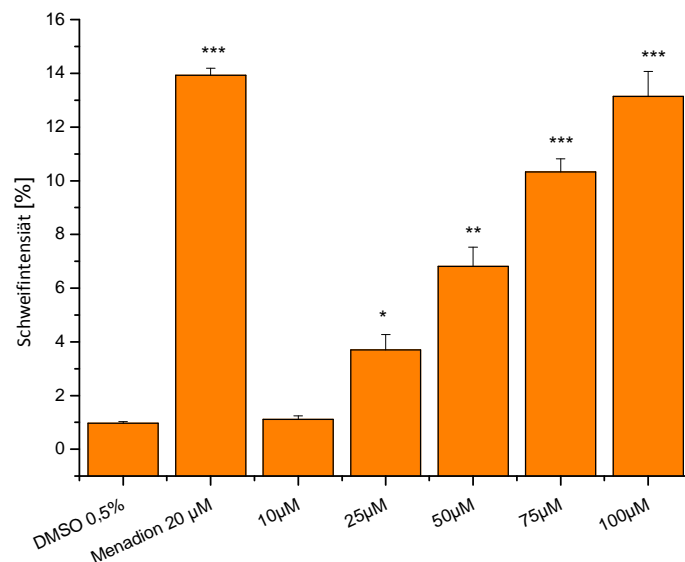


Abb.57: Induktion von DNA-Strangbrüchen durch 3'-Hydroxymethylisoeugenol (10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) nach einstündiger Inkubation (0,5% DMSO, 10% FKS) von HT29 Zellen; abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 3$  in einer Doppelbestimmung; \* signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle (0,5%) (Student's *t*-Test \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Bei der Muttersubstanz Methyleugenol konnte eine DNA-strangbrechende Wirkung in der Einzelzellgelelektrophorese in der höchsten getesteten Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) nach 24-stündiger Inkubation in HT29 Zellen festgestellt werden. Im Vergleich zur Testung an V79 Zellen zeigte sich bei der 24-stündigen Inkubation mit Methyleugenol bereits ab einer Konzentration  $\geq 50 \mu\text{M}$  eine signifikante DNA-schädigende Wirkung. Dies zeigt, dass V79 Zellen sensibler auf die Testsubstanz reagieren. Dieser Unterschied der Sensitivität zwischen HT29 Zellen und V79 Zellen kann auf eine unterschiedliche metabolische Kompetenz, verschiedene DNA-Reparatursysteme und verschiedene Transporterausstattung zurückgeführt werden [Glatt *et al.*, 1990; Fogh, 1975; Azqueta und Collins, 2013; Karlson *et al.*, 1994]. Beim Vergleich von zwei Zelllinien sollte auch die Reparaturkinetik der vorliegenden DNA-Schäden berücksichtigt werden [Azqueta und Collins, 2013]. So könnte bei einer Inkubation von 24 Stunden mit den Testsubstanzen bei HT29 Zellen eine schnellere DNA-Reparatur möglich sein als bei V79 Zellen, wodurch ein Rückgang der detektierten DNA-Strangbruchrate bei HT29 Zellen begründet werden. Weiter könnte die unterschiedliche Verdopplungszeit von Bedeutung sein. Die Verdopplungszeit von V79 Zellen beträgt etwa 12 Stunden, während sie bei HT29 Zellen zwischen 40-60 Stunden beträgt [DSMZ; Fogh, 1975]. So könnten HT29 Zellen möglicherweise mehr Zeit für Reparaturmechanismen im Vergleich zu V79 Zellen haben. Genauere Untersuchungen zur Unterstützung dieser Hypothese sind jedoch notwendig. Auch die Überexpression von Drug Efflux Transporter in Krebszelllinien können bei dem Vergleich von HT29 Zellen und V79 Zellen eine Rolle spielen [Gottesman *et al.*, 2002; Jendzelovsky *et al.*, 2009; Karlson *et al.*, 1994]. Eine besondere Rolle spielen hier die ABC ("*ATP binding cassette*")-Transporter, welche die ATP-Hydrolyse nutzen, um eine Vielzahl an verschiedenen Substraten gegen einen Konzentrationsgradienten aus der Zelle transportieren und so die Konzentration der Substanzen in der Zelle reduzieren. Im Menschen sind drei Subfamilien bekannt, die mit der direkten "*Multidrug*"-Resistenz (MDR) verbunden sind [Sarkadi *et al.*, 2004]. Darunter zählen die B-Subfamilie (ABCG1, P-Glycoprotein), die G-Subfamilie (ABCG2, BCRP) und die C-Subfamilie (ABCC1, MRPs) [Bodo *et al.*, 2003; Fojo *et al.*, 2003]. Es wurde berichtet, dass Substanzen, die ABC Transporter aktivieren, auch Cytochrom P450 Enzyme induzieren [Lum und Gosland, 1995; Jendzelovsky *et al.*, 2009]. Ein Zusammenspiel von dem Efflux-System und den metabolischen Enzymen bilden eine effektive Methode der Substanz-Eliminierung aus Zellen.



V79 Zellen sind bekannt für die fehlende CYP450 Aktivität. Die Anwesenheit von CYP450 Enzymen und die Überexpression von ABC-Transporter in HT29 Zellen sprechen für eine schnellere Eliminierung der Testsubstanzen aus den HT29 Zellen als aus V79 Zellen, so dass dies auch eine vermutete Begründung für die niedrigere DNA-Strangbruchrate der Testsubstanzen in HT29 Zellen darstellen kann [Gottesman *et al.*, 2002; Jendzelovsky *et al.*, 2009; Karlson *et al.*, 1994; Fogh, 1975; Glatt *et al.*, 1990; Doehmer, 2009].

Auch eine Studie von Burkey *et al.* steht mit den Ergebnissen dieser Arbeit im Einklang. Burkey *et al.* konnte in seiner Untersuchung ein gentoxisches Potential im UDS-Assay an Rattenhepatozyten mit metabolischer Aktivierung im Konzentrationsbereich zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  nachweisen [Burkey *et al.*, 2000]. Untersuchungen von Frau Rudakovski [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Junprof. Dr. Esselen] zur Mikrokerninduktion zeigten keine Erhöhung der Mikrokernrate durch Methyleugenol (Konzentration  $\leq 100 \mu\text{M}$ ) nach 24-stündiger Inkubation in HT29 Zellen. Auch Untersuchungen an V79 Zellen zeigten keine Mikrokerninduktion durch Methyleugenol ( $\leq 100 \mu\text{M}$ ) [Groh *et al.*, 2012]. Die Aussagen zur *in vitro* Gentoxizität von Methyleugenol sind je nach Testsystem sehr unterschiedlich. In der Studie von Burkey *et al.* wurden Rattenhepatozyten als Testsystem verwandt; diese Zellen sind metabolisch sehr aktiv und können Methyleugenol metabolisieren. So würde Methyleugenol mittels CYP450 Enzyme zum 1'-Hydroxymethyleugenol umgewandelt werden, welches mit Hilfe von Sulfotransferasen zum ultimalen Kanzerogen (Carbokation) weiter metabolisiert wird [Jeurissen *et al.*, 2006]. HT29 Zellen exprimieren auch CYP450 Enzyme, insbesondere die Isoformen 1A2 und 2C19, welche zur Metabolisierung von Methyleugenol vorrangig ist [Bourguine *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2013; Jeurissen *et al.*, 2006]. Durch die metabolische Kompetenz der HT29 Zellen kann auch in diesem Testsystem Methyleugenol weiter zum aktiven Metaboliten 1'-Hydroxymethyleugenol umgewandelt werden, was die beobachtete DNA-strangbrechende Wirkung begründen würde. Jedoch wurde keine Erhöhung der Mikrokernrate durch Methyleugenol detektiert; dies deutet daraufhin, dass andere Wirkmechanismen zur DNA-strangbrechenden Wirkung von Methyleugenol beitragen.

1'-Hydroxymethyleugenol zeigte im Vergleich zur Muttersubstanz ein deutlicheres gentoxisches Potential. Es ist ein deutlicher Dosis-Wirkungsverlauf zu erkennen und bereits ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  traten nach 24-stündiger Inkubation erste

Signifikanzen auf. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Ergebnissen an V79 Zellen. Auch hier zeigte sich ein deutlich gentoxisches Potential von dem 1'-Hydroxy-Metabolit mit einem DNA-strangbrechenden Potential in Konzentrationen  $\geq 25 \mu\text{M}$  [Groh *et al.*, 2012].

In der Literatur wird beschrieben, dass das gentoxische Potential hauptsächlich von 1'-Hydroxymethyleugenol ausgeht. Jeurissen *et al.* stellte in ihrer Arbeit die Bioaktivierung von Methyleugenol dar. Methyleugenol wird demnach über CYP 450 Enzyme zu 1'-Hydroxymethyleugenol metabolisiert, welches über eine Sulfotransferase-katalysierte Umsetzung zum Carbokation reagiert; dieses Carbokation kann mit der DNA interagieren und DNA-Addukte bilden [Jeurissen *et al.*, 2006]. Das in der Arbeit von Groh *et al.* verwendete Zellsystem (V79 Zellen) besitzt keine Sulfotransferase-Aktivität [Glatt, 1993]. Damit stellt sich die Frage, ob die Sulfotransferase das einzige Enzym zur Toxifizierung von den Phase-I-Metaboliten darstellt. Auch die nicht stärkere DNA-strangbrechende Wirkung an HT29 Zellen im Vergleich zu V79 Zellen gibt einen Hinweis darauf, dass dieser Metabolisierungsweg über die Sulfotransferase-katalysierte Umsetzung zum Carbokation eher nicht bedeutend für die DNA-strangbrechende Wirkung der Substanz ist. Vermutlich kommen weitere Mechanismen zur Toxifizierung der Substanz zum Tragen. Jedoch scheint die Aktivierung über die Sulfotransferase-katalysierte Umsetzung bei einem weiteren gentoxischen Endpunkt (Mikrokerninduktion) eine Rolle zu spielen. In der Arbeit von Frau Rudakovski wurde im Gegensatz zur Muttersubstanz eine signifikante Erhöhung der Mikrokernrate an HT29 Zellen in allen getesteten Konzentrationen bis  $100 \mu\text{M}$  detektiert, jedoch war keine Konzentrationsabhängigkeit festzustellen [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Junprof. Dr. Esselen]. Hingegen trat in der Untersuchung von Frau Kajzar an V79 Zellen ähnlich der Muttersubstanz keine Bildung von Mikrokernen nach Inkubation mit 1'-Hydroxymethyleugenol auf [Groh *et al.*, 2012]. Diese Daten deuten an, dass weitere Mechanismen für die DNA-strangbrechenden Effekte verantwortlich sind. Es bedarf nun weiterer Untersuchungen zur Klärung des Mechanismus der Toxifizierung.

Methyleugenol-2',3'-epoxid zeigte ein deutlich stärkeres DNA-schädigendes Potential als die Muttersubstanz. Diese Ergebnisse werden auch durch die Studie an V79 Zellen bestätigt. Auch hier besitzt Methyleugenol-2',3'-epoxid ein deutlich gentoxisches Potential [Groh *et al.*, 2012]. Dem stabilen Epoxid wird auch in der

Literatur ein gentoxisches Potential zugeschrieben [Gardner *et al.*, 1996; NTP, 2000]. Auch in der Untersuchung zur Mikrokerninduktion an HT29 Zellen wurde eine signifikante Wirkung in einer Konzentration von 100  $\mu$ M beobachtet [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Junprof. Dr. Esselen]. Ebenso wurde in der Studie von Frau Kajzar eine signifikante Zunahme an Mikrokernen nach einstündiger Inkubation in der höchsten Konzentration von 100  $\mu$ M an V79 Zellen nachgewiesen [Groh *et al.*, 2012]. Sowohl die Mikrokerninduktion als auch die DNA-strangbrechende Wirkung von Methyleugenol-2',3'-epoxid tragen möglicherweise zur gezeigten Wachstumshemmung nach 72-stündiger Inkubation von V79 Zellen oder HT29 Zellen bei [Groh *et al.*, 2012]. In wie weit es sich möglicherweise um die Induktion apoptotischer Prozesse handelt, muss in weiterführenden Arbeiten verifiziert werden (siehe Diskussion Kap. 5.6).

Anders stellte sich die Wirkung des 3'-Oxomethylisoeugenols dar. Nach einstündiger Inkubation wurde keine DNA-schädigende Wirkung beobachtet; allerdings wurde nach 24 Stunden Inkubation eine konzentrationsabhängige DNA-strangbrechende Wirkung festgestellt. In der Stabilitätsuntersuchung von Vallicotti an V79 Zellen mittels HPLC/UV gab es Hinweise darauf, dass nach 24-stündiger Inkubation 3'-Oxomethylisoeugenol zu 3'-Hydroxymethylisoeugenol weitermetabolisiert werden könnte [Vallicotti, Forschungsarbeit 2012 in der AG Junprof. Dr. Esselen; unveröffentlichte Daten]. So konnte eine weitere Untersuchung an HT29 Zellen auf die Stabilität des 3'-Oxomethylisoeugenols das Ergebnis von Frau Vallicotti bestätigen. Hier zeigte sich ein Signal zur gleichen Retentionszeit bei der 24-stündigen Inkubation mit 3'-Oxomethylisoeugenol als auch nach null Stunden bzw. einstündiger Inkubation mit 3'-Hydroxymethylisoeugenol an HT29 Zellen. Weiter ergaben sich Hinweise anhand der UV-Spektren, dass 3'-Hydroxymethylisoeugenol gebildet wird. Jedoch steht eine Quantifizierung mittels Massenspektrometer (MS) noch aus. Basierend auf diesen Daten könnten die Ergebnisse der Gentoxizitätsuntersuchungen durch folgende Hypothese begründet werden. So scheint nicht 3'-Oxomethylisoeugenol selbst kein DNA-strangbrechendes Potential aufzuweisen, da nach einstündiger Inkubation keine DNA-Strangbrüche detektiert werden konnten. Jedoch zeigte der Metabolit 3'-Hydroxymethylisoeugenol DNA-strangbrechende Wirkung.

Diese Ergebnisse zum DNA-strangbrechenden Potential von 3'-Oxomethylisoeugenol stehen im Einklang mit den Daten zur Mikrokerninduktion. Nach einstündiger Inkubation von V79 Zellen mit 3'-Oxomethylisoeugenol ( $\leq 100 \mu\text{M}$ ) wurde keine signifikante Erhöhung der Mikrokernrate festgestellt, wohingegen nach 24-stündiger Inkubation es zu einer signifikanten Zunahme von Mikrokernen in Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$  kam [Groh *et al.*, 2012]. Auch in HT29 Zellen zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation eine konzentrationsabhängige Mikrokerninduktion in Konzentrationen  $\geq 10 \mu\text{M}$  3'-Oxomethylisoeugenol [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Junprof. Dr. Esselen]. Zusammenfassend induzieren Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol Mikrokerne *in vitro*. Zur Aufklärung des Wirkmechanismus der Mikrokernbildung durch die oxidativen Metabolite wurde die CREST-Färbung durchgeführt. Hierbei zeigte sich der aneugene Ursprung chromosomaler Schäden in V79 Zellen. Daraus lässt sich ableiten, dass diese Metaboliten mit den Mikrotubulis des Spindelapparates reagieren können und somit eine Störung der Chromosomenverteilung hervorrufen [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Junprof. Dr. Esselen]. Sowohl die DNA-strangbrechende Wirkung als auch die Mikrokerninduktion von 3'-Oxomethylisoeugenol tragen möglicherweise zur gezeigten Wachstumshemmung nach 72-stündiger Inkubation von V79 Zellen oder HT29 Zellen bei [Groh *et al.*, 2012]. Ob es sich möglicherweise um die Induktion apoptotischer Prozesse handelt, muss in weiterführenden Arbeiten verifiziert werden (siehe Diskussion Kap. 5.6).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese, dass Methyleugenol und die ausgewählten oxidativen Metaboliten eine DNA-strangbrechende Wirkung aufweisen und die Literaturdaten bestätigen. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass das DNA-strangbrechende Potential der Metaboliten das Potential der Muttersubstanz übersteigt. Zudem wurde die Bildung weiterer Intermediate, die ebenfalls DNA-Schäden generieren können, in der Zellkultur beobachtet, wie am Beispiel von 3'-Oxomethylisoeugenol gezeigt werden konnte. Diese Metaboliten müssen jedoch noch weiter untersucht werden. Weiter ist der genaue Wirkmechanismus der Genotoxizität noch unklar, da nicht alle Metabolite und die Muttersubstanz mikrokerninduzierendes Potential aufweisen. Einen Hinweis auf den Wirkmechanismus der Metabolite Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol gab der aneugene Ursprung der Mikrokerninduktion. Dies

deutet daraufhin, dass die Testsubstanzen mit den Proteinstrukturen des Spindelapparates wechselwirken und so die Chromosomenverteilung stören [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Junprof. Dr. Esselen].

Insgesamt weisen die erzielten Ergebnisse darauf hin, dass Untersuchungen zum gentoxischen Potential oxidativer Metaboliten und nicht nur der 1'-Hydroxy-Metabolit in der Risikobewertung von Methyleugenol berücksichtigt werden sollten. Ob dies auch für weitere Substanzen der Klasse der Alkenylbenzene gilt, sollte in weiterführenden Studien verifiziert werden.

Zur weiteren Untersuchung der Wirkmechanismen der Gentoxizität von Methyleugenol und den Metaboliten und zur Eingrenzung der zellulären Zielenzyme wurde die Zellzyklusverteilung von HT29 Zellen betrachtet. Nach Inkubation mit 1'-Hydroxymethyleugenol und Methyleugenol-2',3'-epoxid zeigte sich eine signifikante Arretierung in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus in der höchsten getesteten Konzentration von 100 µM. Die Inkubation mit 3'-Oxomethylisoeugenol an HT29 Zellen führte bereits in Konzentrationen  $\geq 50$  µM zu einem G<sub>2</sub>/M-Arrest [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Junprof. Dr. Esselen]. Zellen, die in der G<sub>2</sub>/M-Phase nach der Inkubation mit der Testsubstanz arretiert werden, werden kurz vor der Mitose angehalten. Dies könnte ein mögliches Anzeichen für einen genetischen Defekt (DNA Schädigung) oder/und eine Interaktion der Testsubstanz mit anderen Bestandteilen der Zelle darstellen. Eine mögliche Ursache für den G<sub>2</sub>/M-Arrest könnte die Wechselwirkung mit den Proteinstrukturen des Spindelapparates, welche in der Immunofluoreszenzfärbung der Zellkerne als aneugener Effekt deutlich werden, zeigen. Hierdurch wird die richtige Ausbildung des Spindelapparates, die korrekte Chromosomenverteilung und letztlich auch die Zellteilung behindert. Für die Metaboliten Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol konnte ein aneugener Mechanismus der Mikrokernbildung detektiert werden.

In einer Untersuchung von Yafune *et al.* an Rattenleber wurde eine Störung der Zellzyklusregulation nach Behandlung mit Methyleugenol gezeigt, welche sich in einem M-Phase-Arrest äußerte. Weiter wurde in dieser Studie der Einfluss von Methyleugenol auf die Genexpression verschiedener Zellzyklusproteine wie Cdc2, Aurora Kinase B, pHiston H3 und HP1 $\alpha$  untersucht, welche typische Proteine der G<sub>2</sub>/M-Phase darstellen [Yafune *et al.*, 2013]. Auch diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass es sich bei der Gentoxizität von Methyleugenolmetaboliten nicht nur um

die direkte DNA-Schädigung, sondern auch um den Eingriff in andere Zellprozesse handeln kann.

So können auch andere Zielenzyme der DNA-Replikation, wie Histondeacetylasen (HDAC) und Topoisomerasen, bei dem Mechanismus der DNA-Schädigung eine Rolle spielen. Daher werden diese Zielenzyme im Folgenden zur Untersuchung der Wirkmechanismen der Genotoxizität von Methyleugenol und den oxidativen Metaboliten mit einbezogen.

### **5.3 Untersuchung zur Beeinflussung der Histondeacetylaseaktivität und -expression**

Lebensmittelinhaltsstoffe, die in epigenetische Regulationsprozesse eingreifen, rücken zur Zeit in den Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses. Vor allem sekundäre Pflanzenstoffe werden als solche charakterisiert; sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe induzieren Veränderungen des Chromatins (Histonmodifikationen) [Link *et al.*, 2010]. Insgesamt liefert das Forschungsfeld neue Ansätze für das Verständnis der Regulation von Erkrankungsprozessen. So wird im Verlauf der Kanzerogenese eine Vielzahl an Genen in ihrer Aktivität moduliert. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass gerade hierbei epigenetische Veränderungen eine erhebliche Rolle spielen. Posttranslationale Histonmodifikationen durch Lebensmittelinhaltsstoffe werden als neue Biomarker für ein chemoprotektives Potential diskutiert. Einer der wichtigsten posttranslationalen epigenetischen Regulationen der Genexpression ist die Acetylierung und Deacetylierung von Histonen [Marks *et al.*, 2004]. Hierbei spielen zwei Enzyme eine wichtige Rolle, die Histonacetyltransferasen (HAT) und die Histondeacetylasen (HDAC). HDACs sind zinkgebundene Metalloproteine, welche die Eliminierung von Acetylgruppen an Histonenden katalysieren. Eine Deacetylierung der Histone führt zu einer engeren Bindung der DNA an den Histonkern und letztlich zu einer Chromatinkondensation und zur Unterdrückung der Transkription. HDACs sind in verschiedene zelluläre Ereignisse beteiligt wie Transkription, Zellzyklusverlauf, Gensilencing, Zelldifferenzierung, DNA-Replikation und DNA-Reparatur [Marks *et al.*, 2004; Dokmanovic und Marks, 2005].

Neben der Diskussion über mögliche chemopräventive Wirkungen der Lebensmittelinhaltsstoffe im Hinblick auf posttranslationale Histonmodifikationen, gibt es jedoch viele kontroverse Stimmen, die solche Modifikationen mit einer Störung der DNA-Integrität verbinden. Daher werden hier noch viele Studien zum mechanistischen Verständnis notwendig sein. Viele bekannte HDAC-Hemmstoffe z.B. EGCG induzieren DNA-Strangbrüche [Rajendran *et al.*, 2011].

Im Folgenden soll die Frage geklärt werden, ob Methyleugenol und die ausgewählten oxidativen Metaboliten einen Einfluss auf die HDAC-Aktivität und/oder Expression

haben und ob die HDAC-Beeinflussung einen Beitrag zum DNA-strangbrechenden Potential der Testsubstanzen leistet.

Die HT29 Zellen wurden hierzu für 24 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert und die Enzymaktivität wurde mit einem HDAC zellbasierten Aktivitätsassay-Kit untersucht. Als Substrat für die HDAC diente BOC-*N*<sup>ε</sup>-acetyl-L-lysin-7-amino-4-methylcoumarin. Rekombinante HDAC wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Als HDAC-Inhibitor wurde Trichostatin A (TA) verwendet, welcher eine 80%ige Inhibierung der HDAC-Aktivität in einer Konzentration von 2  $\mu$ M zeigte (Abb.63).

Methyleugenol und der Hauptmetabolit 1'-Hydroxymethyleugenol zeigten keinen Effekt auf die HDAC-Aktivität bis zu einer Konzentration von 100  $\mu$ M. Jedoch zeigten die Metabolite Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol eine konzentrationsabhängige Hemmung der HDAC-Aktivität, die sich ab einer Konzentration von 50  $\mu$ M als statistisch signifikant erwies (Abb.58). Für Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol wurden IC<sub>50</sub>-Werte von  $38 \pm 3$   $\mu$ M und  $54 \pm 20$   $\mu$ M ermittelt.

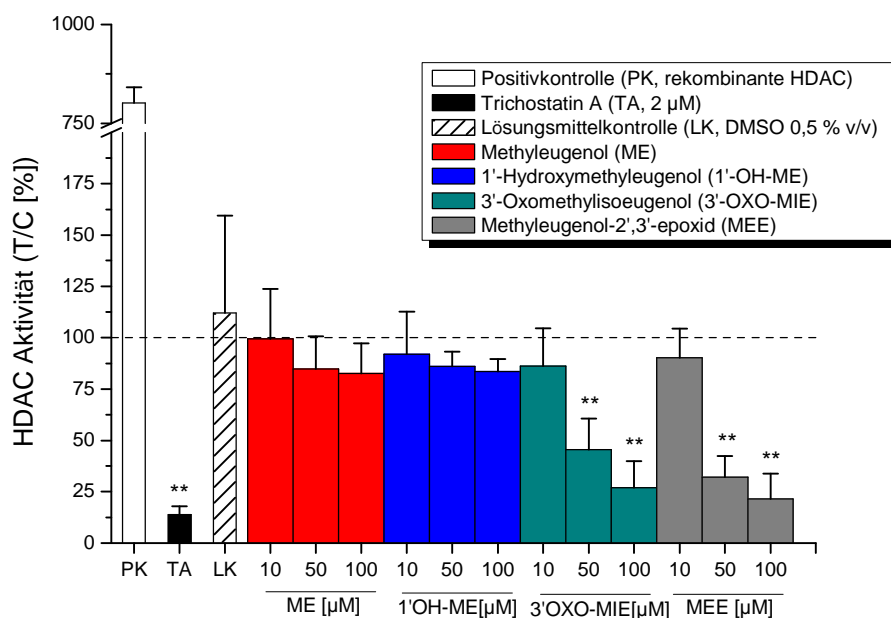


Abb.58: Hemmung der HDAC-Aktivität in HT29 Zellen nach einer 24-stündigen Inkubation mit Methyleugenol und Methyleugenolmetaboliten. Rekombinante HDAC wurde als Positivkontrolle verwendet und Trichostatin A (TA) als spezifischer HDAC-Inhibitor. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; n = 3 in einer Doppelbestimmung; \* signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle (0,5%) (Student's *t*-Test \*\* = *p* < 0,01).



Im weiteren Verlauf sollte untersucht werden, ob die Beeinflussung der HDAC-Aktivität mit einer Änderung des Proteinstatus verschiedener HDAC der Klassen I und II (HDAC 2, 3, 4, 5 und 6) einhergeht; dies wurde mittels Western Blot Analyse untersucht.

Hierzu wurden HT29 Zellen mit Methyleugenol und den ausgewählten Metaboliten für 24 Stunden inkubiert. Nach der Lyse der Zellen und der Aufarbeitung wurde der Proteingehalt mittels Bradford-Assay bestimmt. Anschließend wurden die Proteine der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Abschließend erfolgt die Markierung mit den spezifischen Antikörpern gegen HDAC 1, 2, 3, 4, 5 und 6, die Detektion mittels Lumi-Imager und die densitometrische Auswertung.

Methyleugenol und 1'-Hydroxymethyleugenol zeigten keine Effekt auf die Expression von HDAC 1. Ebenso zeigten die Metabolite Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol keine Änderung des HDAC1-Proteinstatus (Abb.59)

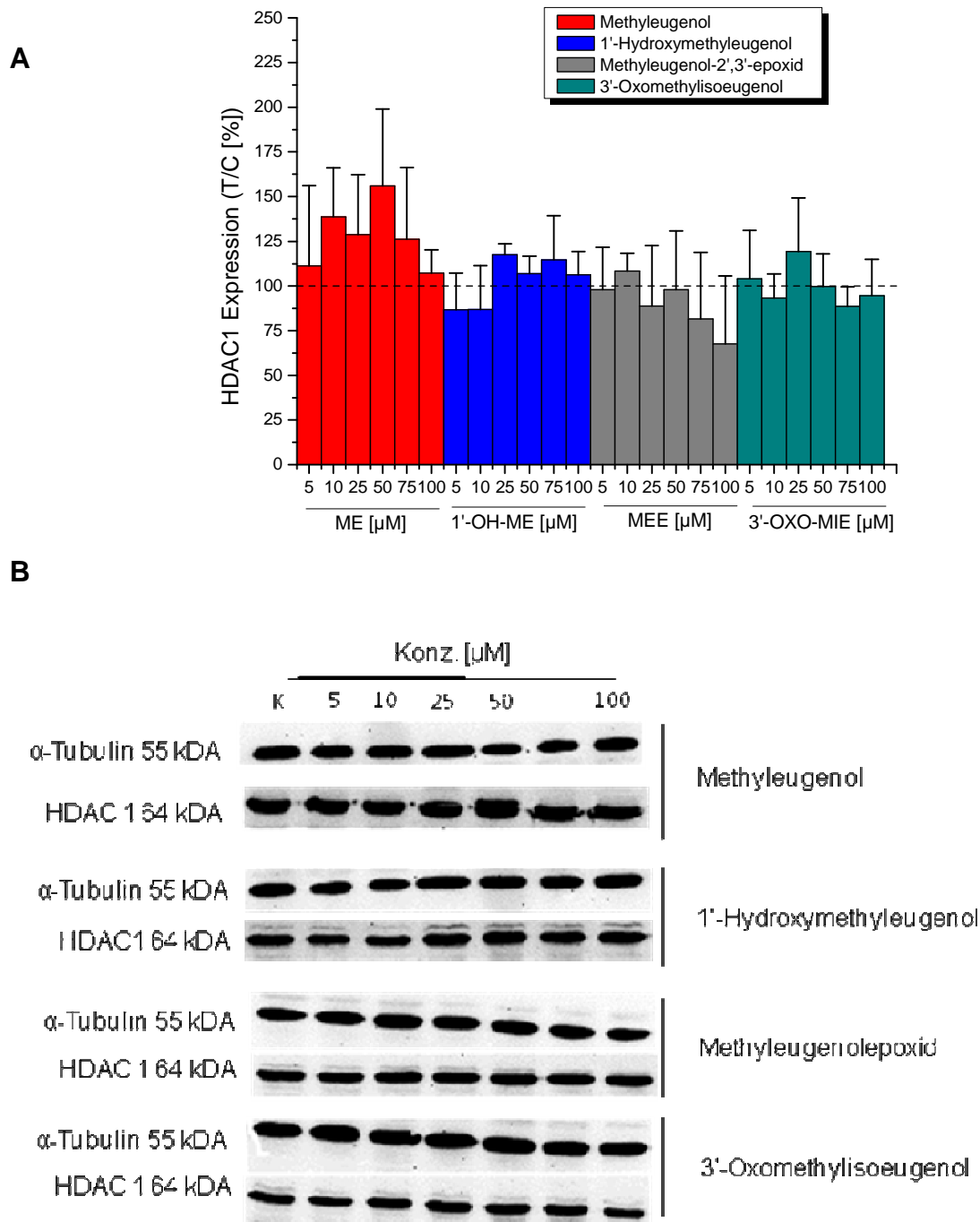


Abb.59: (A) Proteinstatus von HDAC 1 nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MIE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%).

Um auszuschließen, dass ein Effekt auf die Expression von weiteren HDAC Klassen durch Methyleugenol und die Metabolite erfolgt, wurde mittels Western Blot Analyse HDAC 2, 3, 4, 5 und 6 untersucht. Auch hier zeigte sich keine Änderung des Proteinstatus nach Inkubation mit Methyleugenol oder einem der ausgewählten Metabolite (Abb.60 bis Abb.64). Auch Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol zeigten keine Effekte auf die Expression von HDAC, obwohl sie eine deutliche Beeinflussung der Aktivität auf HDAC zeigten.

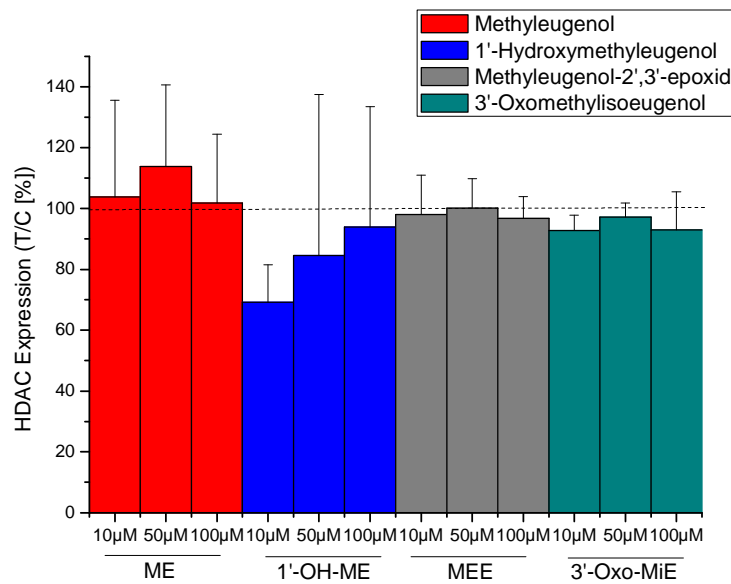
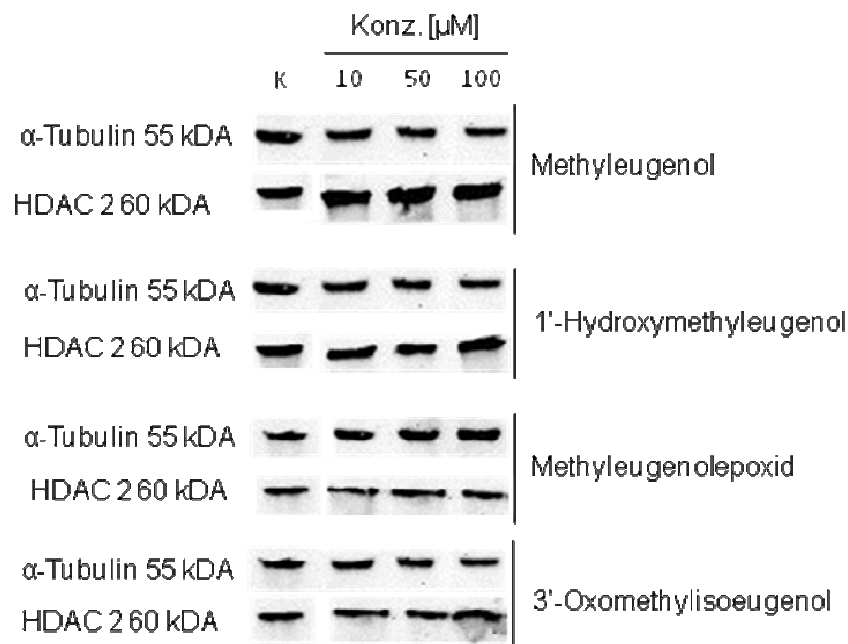
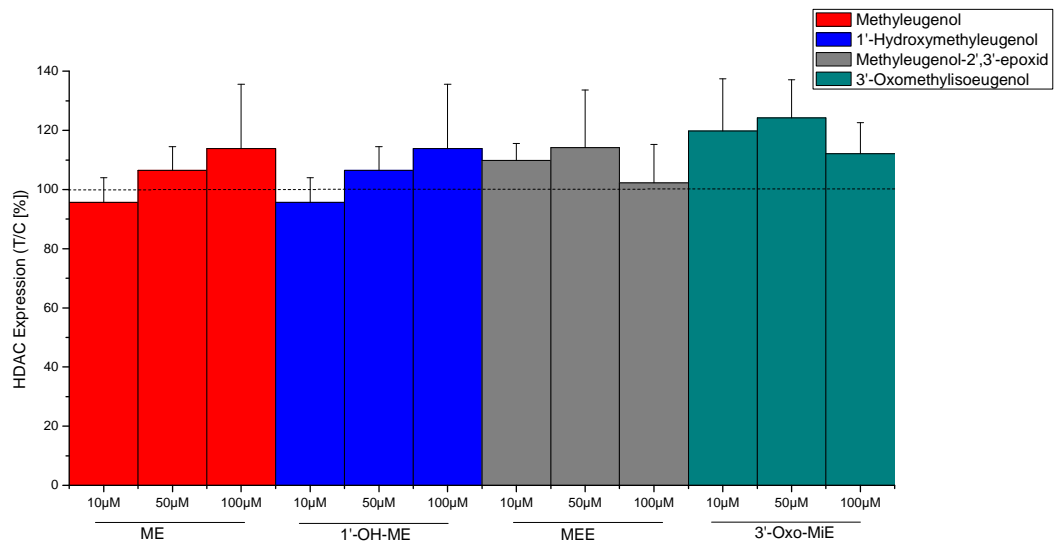
**A****B**

Abb.60: (A) Proteinstatus von HDAC 2 nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MiE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%).

**A**



**B**

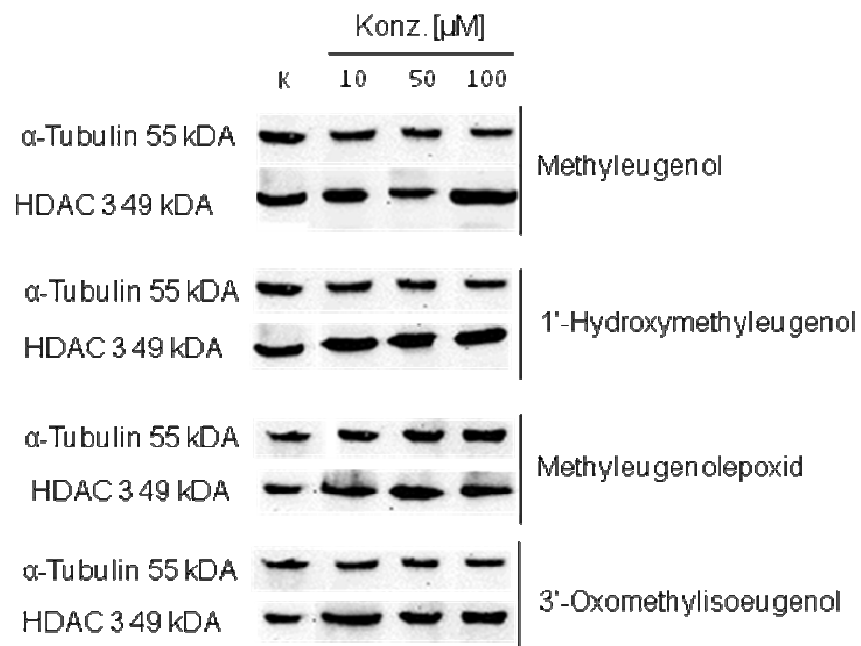


Abb.61: (A) Proteinstatus von HDAC 3 nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MIE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%).

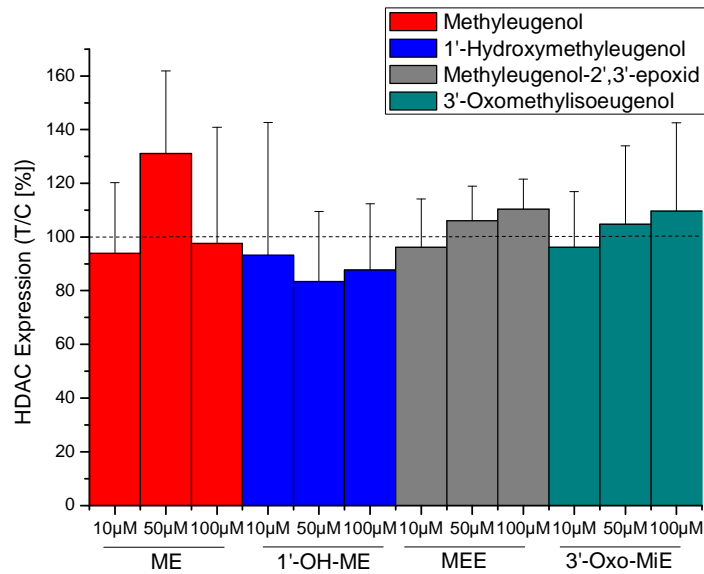
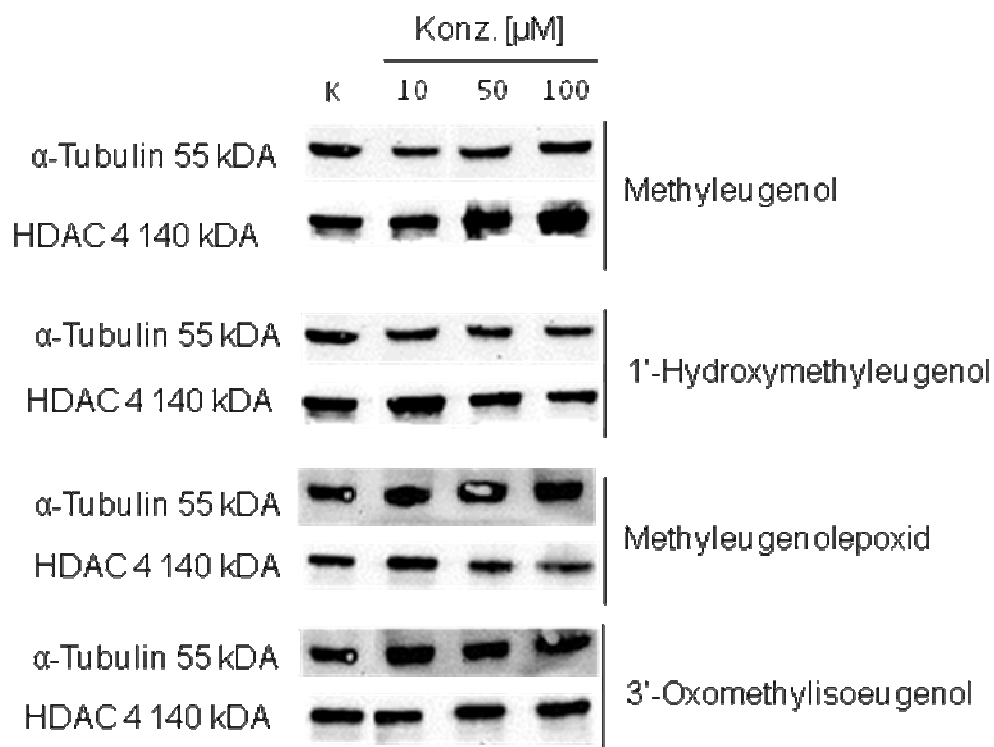
**A****B**

Abb.62: (A) Proteinstatus von HDAC 4 nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MIE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%).

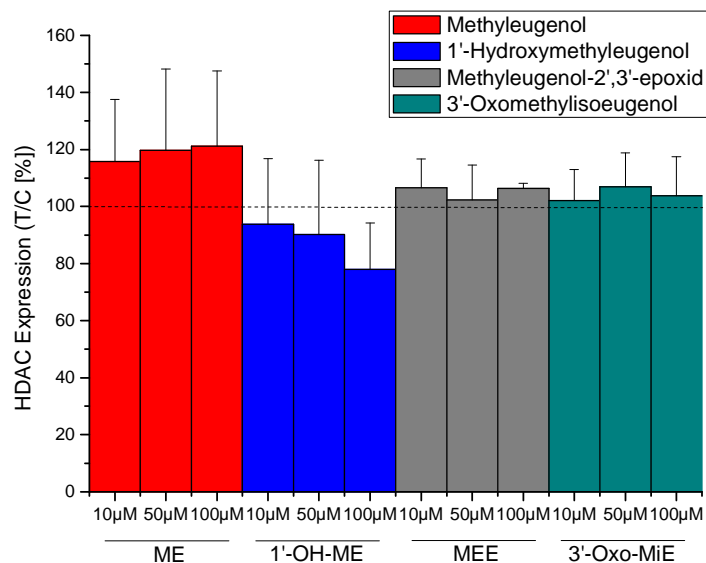
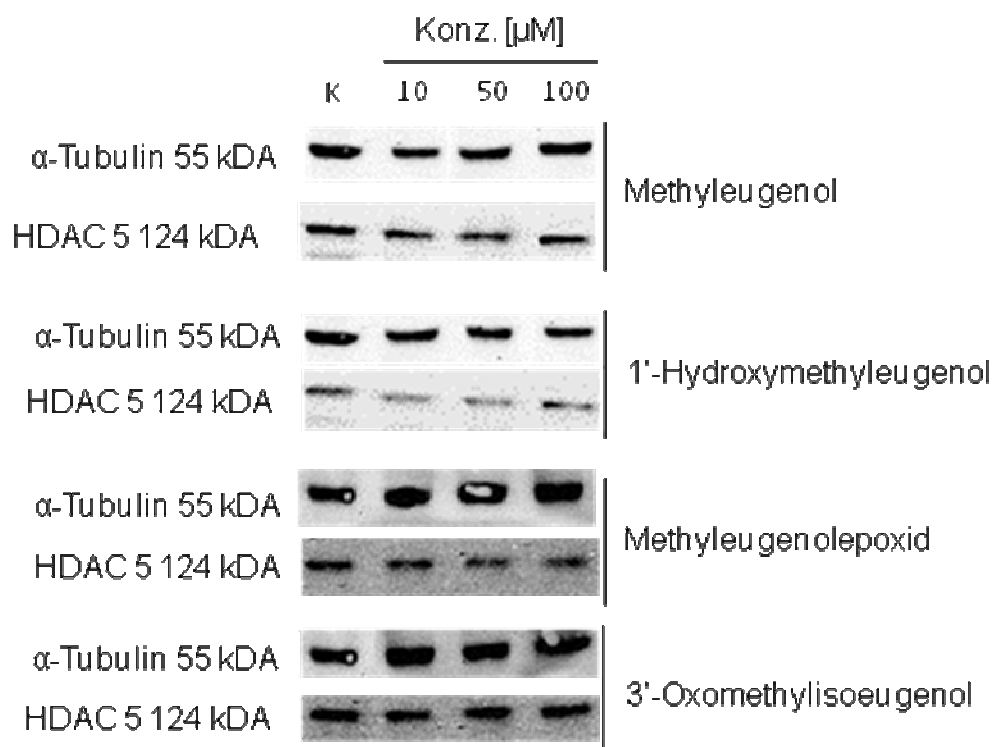
**A****B**

Abb.63: (A) Proteinstatus von HDAC 5 nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MiE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%).

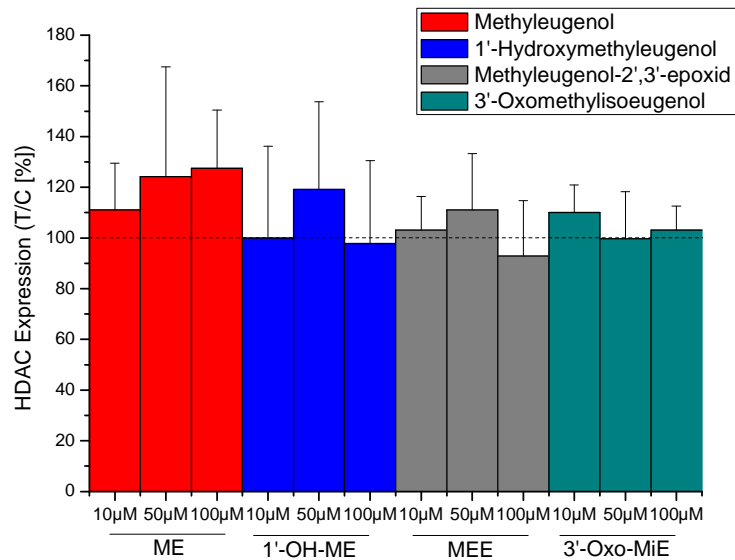
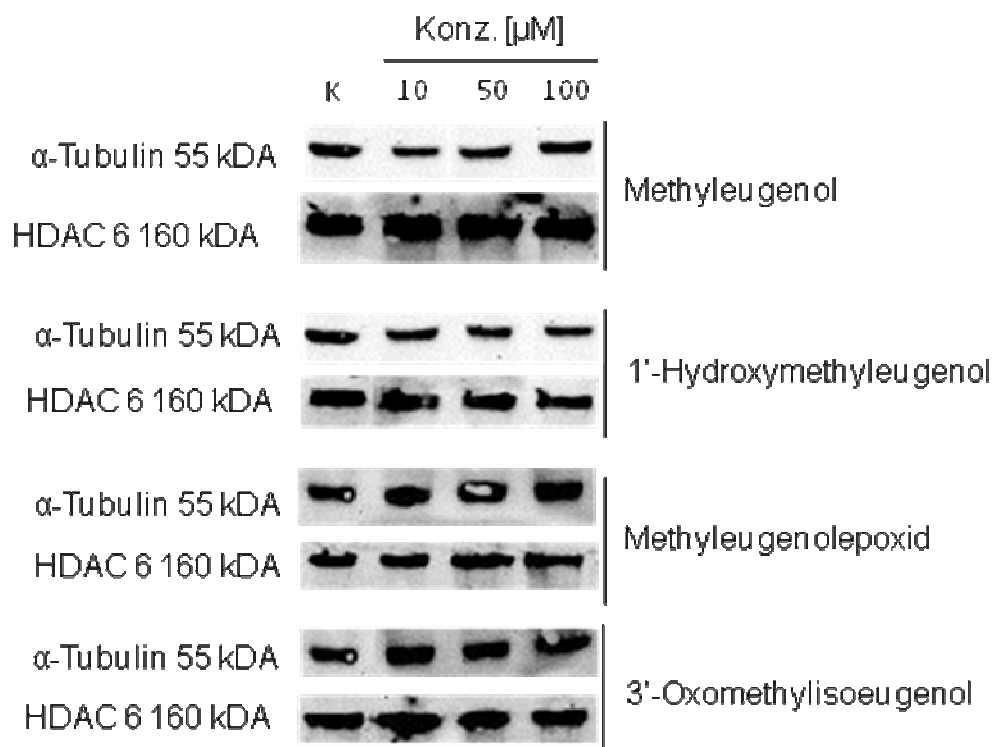
**A****B**

Abb.64: (A) Proteinstatus von HDAC 6 nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MIE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%).



Die zelluläre HDAC-Aktivität durch eine direkte Inhibition des HDAC-Enzyms und durch Änderung des HDAC Proteinstatus beeinflusst werden. Da auf Expressionsebene der HDAC-Isoenzyme 1,2,3,4,5,6 keine Änderungen sichtbar wurden, deutet dies darauf hin, dass es sich bei den beobachteten Effekten auf die HDAC-Aktivität um eine direkte Interaktion mit dem Enzym handelt, was in einem zellfreien Enzymassay verifiziert werden müsste. Aber auch andere HDAC-Isoformen können bei der Inhibition der HDAC-Aktivität eine Rolle spielen; dies müsste jedoch in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Die Beeinflussung der HDAC-Aktivität kann einen möglichen Mechanismus für die DNA-strangbrechenden Eigenschaften der Metabolite Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol darstellen. Jedoch konnte für Methyleugenol und 1'-Hydroxymethyleugenol keine Beeinflussung der HDAC-Aktivität und Expression nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass auch andere Wirkmechanismen für die DNA-strangbrechende Wirkung dieser Substanzen in Frage kommen.

HDAC Inhibition und genomische Instabilität hängen mit verschiedenen Mechanismen zusammen. Dieser Effekt kann auch mit zytotoxischen Eigenschaften dieser Metabolite im Einklang stehen. So zeigten in vorangegangenen Studien auch nur die beiden Metabolite Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol signifikante wachstumshemmende Eigenschaften an HT29 Zellen [Groh *et al.*, 2013]. Dieser Effekt konnte auch an V79 Zellen bestätigt werden [Groh *et al.*, 2012]. Auch kann eine erniedrigte HDAC-Aktivität mit einem G<sub>2</sub>/M-Arrest des Zellzyklus zusammenhängen [Saldanha *et al.*, 2014]. HT29 Zellen zeigten nach Inkubation mit Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol eine signifikante Arretierung in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Junprof. Dr. Esselen]. HDAC sind auch in der Lage mit Proteinen des Zytoskeletts zu interagieren. So ist auch bekannt, dass eine erhöhte Acetylierung des Tubulins, welches einen großen Bestandteil des Zytoskeletts ausmacht, mit einer niedrigen Enzymaktivität der HDAC zusammenhängt [Spange *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011]. In einer Arbeit von Rudakovski konnte nachgewiesen werden, dass die beobachtete Mikrokerninduktion nach Inkubation mit Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol aneugenischen Ursprungs ist. Dies deutet darauf hin, dass diese Metaboliten an einer Störung des mitotischen Spindelapparats beteiligt sein können [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Junprof. Dr. Esselen]. Weiter

können HDAC-Hemmstoffe die DNA für exogene gentoxische Schäden sensitiveren und die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induzieren. Ebenso können HDAC-Hemmstoffe Chromosomenveränderungen hervorrufen [Eot-Houllier *et al.*, 2009]. Einige Lebensmittelinhaltsstoffe wie beispielsweise Resveratrol wurden als HDAC-Inhibitoren mit DNA-strangbrechenden Eigenschaften charakterisiert [Rajendran *et al.*, 2011].

Zusammenfassend zeigten weder Methyleugenol noch die ausgewählten oxidativen Metabolite einen Effekt auf den Proteinstatus der HDAC-Isomere 1, 2, 3, 4, 5 und 6. Allerdings zeigten die Metabolite Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol eine Hemmung der HDAC-Aktivität in Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$ , was einen möglichen Wirkmechanismus für die DNA-strangbrechenden Eigenschaften der Metabolite darstellt. Jedoch wurde für die Muttersubstanz und den 1'-Hydroxy-Metabolit keine Beeinflussung der HDAC-Aktivität nachgewiesen. So können auch andere Mechanismen für die DNA-strangbrechende Wirkung der Testsubstanzen eine Rolle spielen. Weitere zelluläre Zielenzyme, welche im Folgenden untersucht wurden und auch eine wichtige Rolle bei der DNA-Integrität spielen, sind Topoisomerasen.

## **5.4 Untersuchung der Beeinflussung von Topoisomerasen**

In dieser Arbeit wurde die Beeinflussung humaner Topoisomerasen I und II durch Methyleugenol und drei ausgewählte oxidative Metabolite 1'-Hydroxymethyleugenol, Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol untersucht sowie damit zusammenhängend, die aus dem potentiellen Wirkmechanismus ergebende mögliche Konsequenz für die DNA-Integrität.

### **5.4.1 Einfluss von Methyleugenol und den oxidativen Metaboliten auf die katalytische Aktivität der Topoisomerase I**

Die Beeinflussung der katalytischen Aktivität der Topoisomerase I durch Methyleugenol und die oxidativen Metaboliten wurde mittels Plasmid-Relaxationsassay untersucht. Die Topoisomerase I überführt das Substrat superspiralisierte Plasmid-DNA (pUC18) in die relaxierte Form. Die beiden DNA-Formen können mittels Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt werden, wobei die superspiralisierte DNA weiter ins Gel migriert als die relaxierte Form.

Im Vergleich zwischen Spalte 1 und Spalte 2 ist festzustellen, dass durch Zugabe von Topoisomerase I die superspiralisierte pUC18 in die relaxierte Form überführt wird und im Agarosegel die deutliche Auftrennung der beiden DNA-Formen sichtbar wird. Als Positivkontrolle wurde Camptothecin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt (Spalte 9). Die Lösungsmittelkontrolle DMSO (3,3%) (Spalte 8) zeigt keinen Effekt auf die katalytische Aktivität der Topoisomerase I im Vergleich zur Testung ohne DMSO (Spalte 2).

Methyleugenol und der Hauptmetabolit 1'-Hydroxymethyleugenol zeigten keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität der Topoisomerase I in Konzentrationen bis 200  $\mu\text{M}$  (Abb.65).

Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pUC18	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Topo I		+	+	+	+	+	+	+	+
Sub [ $\mu\text{M}$ ]			0,1	1	10	100	200		
DMSO 3,3%								+	
Cpt [ $\mu\text{M}$ ]									100

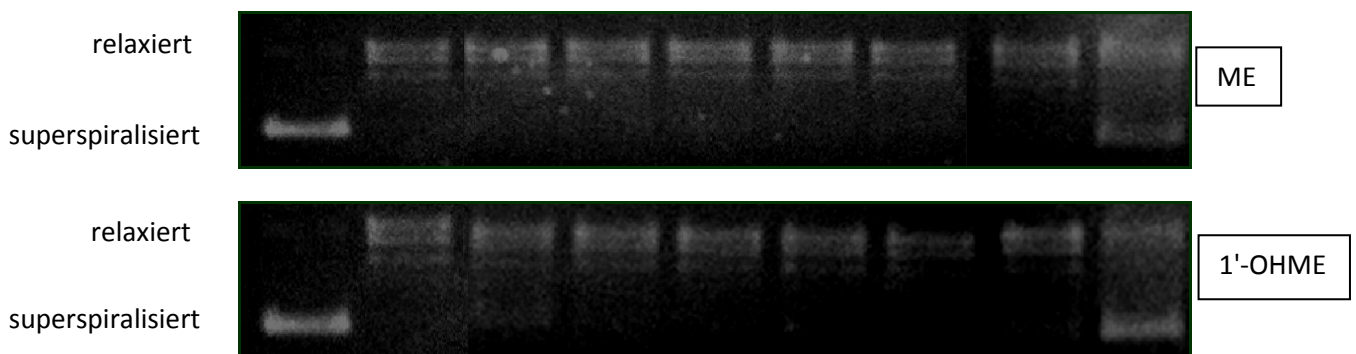
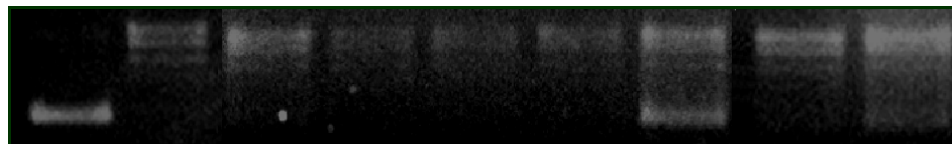


Abb.65: Modulation der katalytischen Aktivität der Topoisomerase I durch Methyleugenol (ME) und 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OHME) (Spalte 3-7) untersucht im Relaxationsassay. Spalte 1: superspiralisierte pUC18; Spalte 2: pUC18 und Topoisomerase I; Spalte 8: Lösungsmittelkontrolle DMSO 3,3%; Spalte 9: Positivkontrolle Camptothecin 100  $\mu\text{M}$ . Abgebildet ist ein repräsentatives Gel aus drei unabhängigen Experimenten.

Methyleugenol-2',3'-epoxid zeigt einen Hemmeffekt auf die katalytische Aktivität der Topoisomerase I in der höchsten getesteten Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  (Abb.66). Methyleugenol-2',3'-epoxid in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  ist sehr hoch für eine Hemmung der Enzymaktivität im isolierten System. Wahrscheinlich wird diese Konzentration auf zellulärer Ebene keine Relevanz haben, da in diesem Konzentrationsbereich schon zytotoxische Effekte zum Tragen kommen würden [Groh *et al.*, 2012].

Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8	9
pUC18	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Topo I		+	+	+	+	+	+	+	+
Sub [ $\mu\text{M}$ ]			0,1	1	10	100	200		
DMSO 3,3%								+	
Cpt [ $\mu\text{M}$ ]									100

relaxiert  
superspiralisiert



MEE

Abb.66: Modulation der katalytischen Aktivität der Topoisomerase I durch Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) (Spalte 3-7) untersucht im Relaxationsassay. Spalte 1: superspiralisierte pUC18; Spalte 2: pUC18 und Topoisomerase I; Spalte 8: Lösungsmittelkontrolle DMSO 3,3%; Spalte 9: Positivkontrolle Camptothecin 100  $\mu\text{M}$ . Abgebildet ist ein repräsentatives Gel aus drei unabhängigen Experimenten.

3'-Oxomethylisoeugenol zeigt eine dosisabhängige Hemmwirkung auf die Aktivität der Topoisomerase I (Abb.67). Bereits bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  3'-Oxomethylisoeugenol ist eine Hemmwirkung auf die Enzymaktivität festzustellen. In Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  entspricht die Hemmwirkung der der Positivkontrolle CPT.

Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pUC18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Topo I		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sub [ $\mu\text{M}$ ]			0,001	0,01	0,1	1	10	100		
DMSO 3,3%									+	
Cpt [ $\mu\text{M}$ ]										100

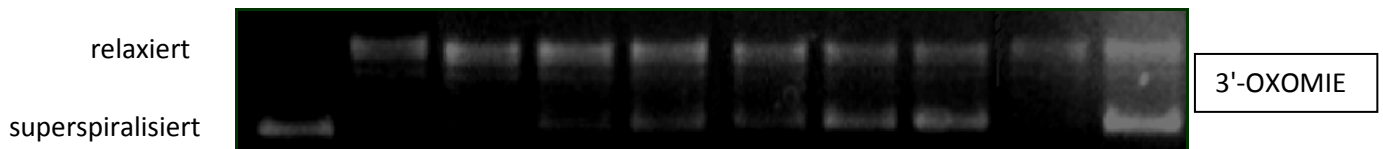


Abb.67: Modulation der katalytischen Aktivität der Topoisomerase I durch 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-OXOMIE) (Spalte 3-8) untersucht im Relaxationsassay. Spalte 1: superspiralisierte pUC18; Spalte 2: pUC18 und Topoisomerase I; Spalte 9: Lösungsmittelkontrolle DMSO 3,3%; Spalte 10: Positivkontrolle Camptothecin 100  $\mu\text{M}$ . Abgebildet ist ein repräsentatives Gel aus drei unabhängigen Experimenten.

Methyleugenol und 1'-Hydroxymethyleugenol zeigen keinen Effekt auf die katalytische Aktivität der Topoisomerase I in Konzentrationen bis 200  $\mu\text{M}$ . Hingegen zeigt Methyleugenol-2',3'-epoxid in der höchsten getesteten Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  einen deutlichen Hemmeffekt auf die Enzymaktivität. Diese Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  Methyleugenol-2',3'-epoxid wird vermutlich in einem zellulären Testsystem keine Relevanz haben, da hier bereits zytotoxische Effekt auftreten [Groh *et al.*, 2012].

3'-Oxomethylisoeugenol zeigte hingegen bereits in sehr niedrigen Konzentrationen ab 0,1  $\mu\text{M}$  eine Beeinflussung der katalytischen Aktivität der Topoisomerase I. Dies deutet darauf hin, dass 3'-Oxomethylisoeugenol ein potenter Hemmstoff der katalytischen Aktivität des rekombinanten Enzyms darstellt. In weiteren Untersuchungen soll der genaue Wirkmechanismus – Unterscheidung katalytischer Hemmstoff oder Topoisomerase-I-Gift – geklärt werden (Kapitel 5.4.3). Bereits andere Alkenylpropanoide wie Eugenol wurden als Topoisomerasehemmstoffe klassifiziert [Maralhas *et al.*, 2006]. In der Studie von Maralhas *et al.* wurde mittels Dekatenierungsassay im Konzentrationsbereich zwischen 5 bis 7500  $\mu\text{M}$  eine dosisabhängige Hemmung der Topoisomerase II durch Eugenol beobachtet [Maralhas *et al.*, 2006]. Es ist bereits in der Literatur beschrieben, dass  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen mit Proteinen reagieren. Beispielsweise wurde Acrylamid, welches auf Grund seiner  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylgruppe mit Thiol-, Hydroxy- und Aminogruppen reagiert, als katalytischer Topoisomerase II Hemmstoff klassifiziert [Sciandrello *et al.*, 2010]. Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die beobachtete Hemmwirkung des 3'-Oxomethylisoeugenols auf die Topoisomerase I eine Begründung für die DNA-strangbrechende Wirkung der Substanz liefert. Es ist bereits bekannt, dass Topoisomerasehemmstoffe auf Grund des erzeugten Torsionsstress DNA-Strangbrüche induzierten [Roca, 2011; Bächler *et al.*, 2014; Zupko *et al.*, 2014]. So wurde in einer Studie von Bächler *et al.* eine katalytische Hemmung der Topoisomerase II nach Inkubation mit den Daidzein-Metaboliten 6-Hydroxydaidzein und 8-Hydroxydaidzein; weiter induzierten die Metaboliten DNA-Schäden. Durch die Hemmung der Enzymaktivität, könnte Torsionsstress an der DNA entstehen, was mit einer verlängerten S-Phase einhergeht [Bächler *et al.*, 2014].

### **5.4.2 Einfluss von Methyleugenol und den oxidativen Metaboliten auf die katalytische Aktivität der Topoisomerase II**

Zur Untersuchung der Beeinflussung der katalytischen Aktivität der Topoisomerase II durch Methyleugenol und den drei ausgewählten oxidativen Metaboliten wurde der Dekatenierungsassay ausgewählt. Als Substrat diente Kinetoplasten DNA (kDNA), welche aus ineinander verknoteten DNA-Zirkeln ein hochmolekulares Netzwerk bildet. Nur die aktive Form der rekombinanten humanen Topoisomerase II ist in der Lage aus dem hochmolekularen Netzwerk der kDNA durch Einführung transienter Doppelstrangbrüche einzelne Minizirkel herauszulösen. In der Agarosegelelektrophorese migrieren die freien Minizirkel ins Gel während die kDNA auf Grund ihrer Struktur/Größe nicht ins Gel migrieren kann. Bei dem Dekatenierungsassay ist darauf zu achten, dass die Topoisomerase II nur unter Anwesenheit von ATP aktiv ist und nicht zwischen Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$  unterschieden werden kann.



Methyleugenol, 1'-Hydroxymethyleugenol, Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol zeigen keinen Einfluss auf die katalytische Aktivität der Topoisomerase II in Konzentrationen bis 200  $\mu\text{M}$  (Abb.68, Spalte 6-10). Als Positivkontrollen wurden die Topoisomerase-II-Gifte Etoposid (100  $\mu\text{M}$ ) (Spalte 4) und Doxorubicin (10  $\mu\text{M}$ ) (Spalte 5) mitgeführt.

Spalte	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
kDNA	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Topo II		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sub [ $\mu\text{M}$ ]						200	100	10	1	0,1
DMSO 3,3%		+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eto [ $\mu\text{M}$ ]				100					100	
Dox [ $\mu\text{M}$ ]					10					10

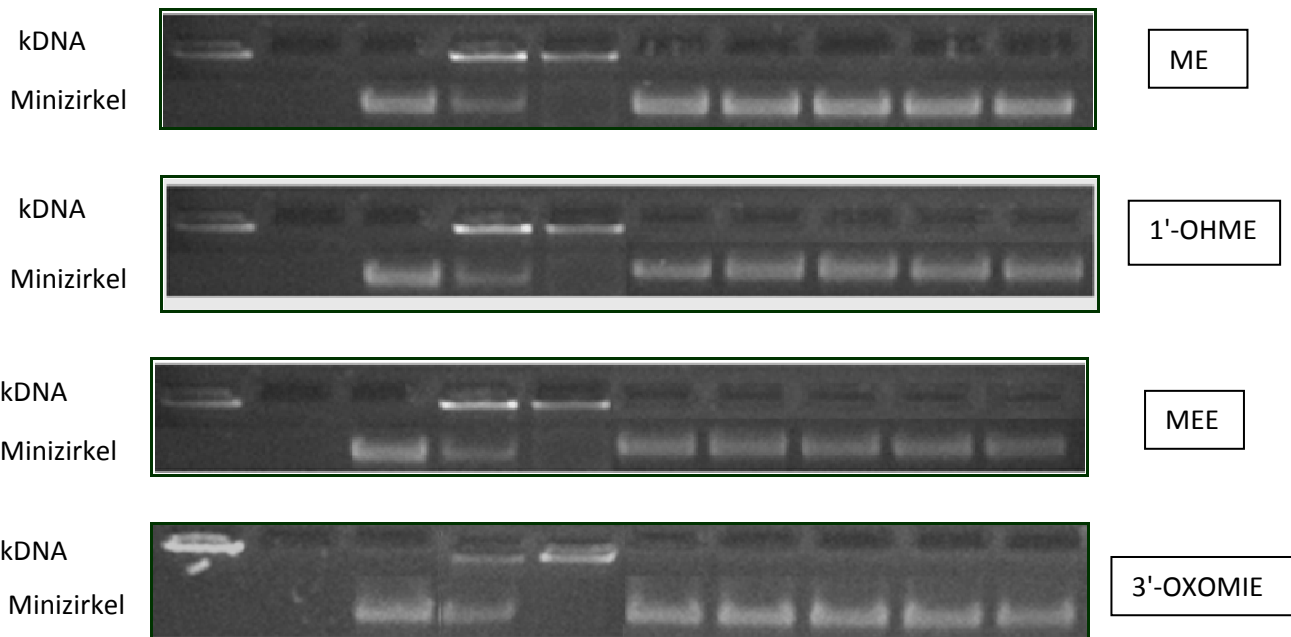


Abb.68: Modulation der katalytischen Topoisomerase II durch Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OHME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE), 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-OXOMIE) untersucht im Dekatenierungsassay. Spalte 1: kinetoplasten DNA (kDNA); Spalte 2: Topoisomerase II; Spalte 3: Lösungsmittelkontrolle DMSO 3,3%; Spalte 4: Positivkontrolle Etoposid 100  $\mu\text{M}$ ; Spalte 5: Positivkontrolle Doxorubicin 10  $\mu\text{M}$ . Abgebildet ist ein repräsentatives Gel aus drei unabhängigen Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen.

### 5.4.3 Wirkung von Methyleugenol und den oxidativen Metaboliten auf zelluläre Topoisomerasen

Auf Grund von verschiedenen Wirkmechanismen der Topoisomerasehemmung wird klassischerweise zwischen katalytischen Inhibitoren und Topoisomerasegiften, die den kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplex stabilisieren, unterschieden. Für den oxidativen Metaboliten 3'-Oxomethylisoeugenol wurde eine effektive Hemmwirkung auf die Topoisomerase-I-Aktivität im zellfreien System in Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  detektiert (Abb. 67). Es stellt sich nun die Frage, ob die Substanz als Topoisomerasegift oder als katalytischer Topoisomeraseinhibitor fungiert und ob der beobachtete Hemmeffekt auch *in vitro* zum Tragen kommt. Um zu testen, ob es sich bei 3'-Oxomethylisoeugenol um ein Topoisomerasegift handelt, wurde der ICE ("*Isolation Complexes of Enzyme to DNA in vivo*")-Bioassay durchgeführt. Hierbei wird in Zellen (HT29 Zellen) die DNA-gebundene Topoisomerase von der freien Topoisomerase mittels Cäsiumchloridgradientenzentrifugation abgetrennt. Nach Fraktionierung werden die einzelnen Fraktionen mit Hilfe einer Blot-Apparatur auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und die Topoisomerasen mit spezifischen Antikörpern gegen Topoisomerase I, II $\alpha$  und II $\beta$  chemoluminometrisch detektiert [Subramanian *et al.*, 2001; Barth *et al.*, 2010].

Methyleugenol und der Hauptmetabolit 1'-Hydroxymethyleugenol zeigten nach einstündiger Inkubation der HT29 Zellen keinen Effekt auf die Stabilisierung der Topoisomerase-I-DNA-Komplexes in Konzentrationen von 200  $\mu\text{M}$  (Abb.69). Auch der oxidative Metabolit Methyleugenol-2',3'-epoxid, welcher im zellfreien Testsystem in der höchsten getesteten Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  eine Hemmung der Topoisomerase-I-Aktivität zeigte, zeigte im ICE-Bioassay keine DNA-gebundene Topoisomerase I in Konzentrationen bis 200  $\mu\text{M}$ . Die Positivkontrolle Camptothecin zeigte hingegen eine für ein Topoisomerasegift typische Stabilisierung des Enzym-DNA-Intermediats (Fraktion 3-8).

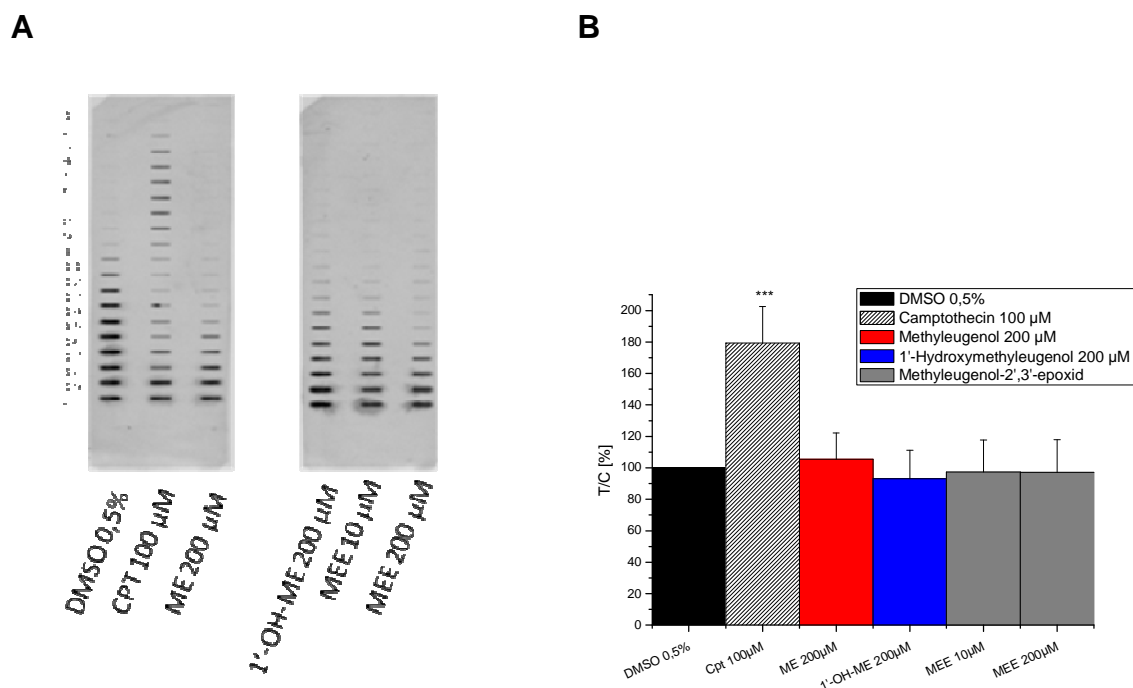


Abb.69: Effekte von Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME) und Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) auf die Stabilisierung des Topoisomerase-I-DNA-Komplexes in HT29 Zellen (ICE-Bioassay). A) Repräsentativer Immunoblot von drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen. B) Die Menge an DNA-gebundener Topoisomerase I wurde in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5%) als [%]-Wert dargestellt. Als Positivkontrolle wurde Camptothecin (CPT 100  $\mu\text{M}$ ) mitgeführt. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Student's *t* Test \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Der Metabolit 3'-Oxomethylisoeugenol, welcher im Relaxationsassay eine effiziente Hemmung der Topoisomerase-I Aktivität bereits in niedrigen Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$  zeigte, zeigt hingegen keine Stabilisierung des Enzym-DNA-Komplexes im ICE-Bioassay an HT29 Zellen in Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$  (Abb.70)

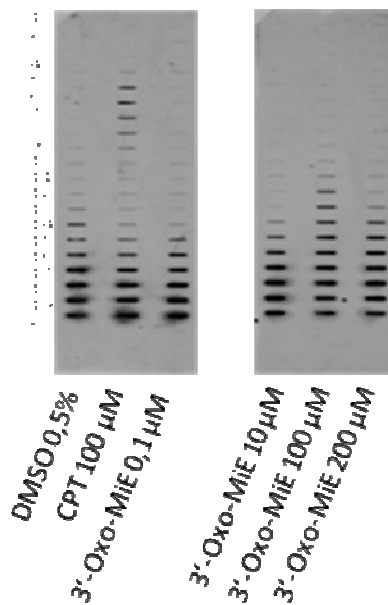
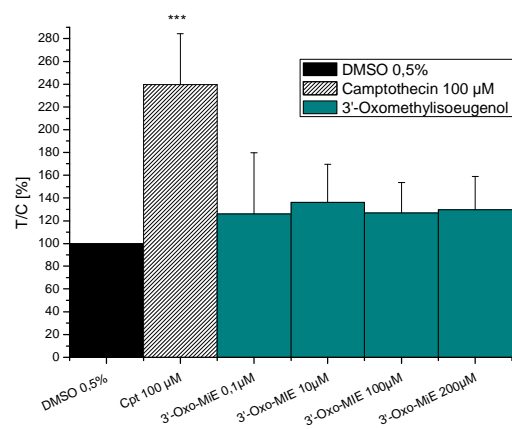
**A****B**

Abb.70: Effekte von 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MiE) auf die Stabilisierung des Topoisomerase-I-DNA-Komplexes in HT29 Zellen (ICE-Bioassay). A) Repräsentativer Immunoblot von drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen. B) Die Menge an DNA-gebundener Topoisomerase I wurde in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5%) als [%]-Wert dargestellt. Als Positivkontrolle wurde Camptothecin (CPT 100 $\mu\text{M}$ ) mitgeführt. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Student's  $t$  Test \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Um auch ausschließen zu können, dass Methyleugenol und die oxidativen Metabolite einen Effekt auf Topoisomerase II *in vitro* ausüben, obwohl sie keine Hemmwirkung auf rekombinante Topoisomerase II ausübten, wurde der ICE-Bioassay auch mittels Antikörpern gegen Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$  durchgeführt. Wie erwartet, zeigte weder die Muttersubstanz noch einer der Metabolite einen Effekt auf die Topoisomerase-II-Isoformen (Abb.71). Das Topoisomerase-II-Gift Etoposid (50  $\mu$ M) zeigte eine deutliche Stabilisierung der Enzym-DNA-Intermediate (Fraktion 5-9).

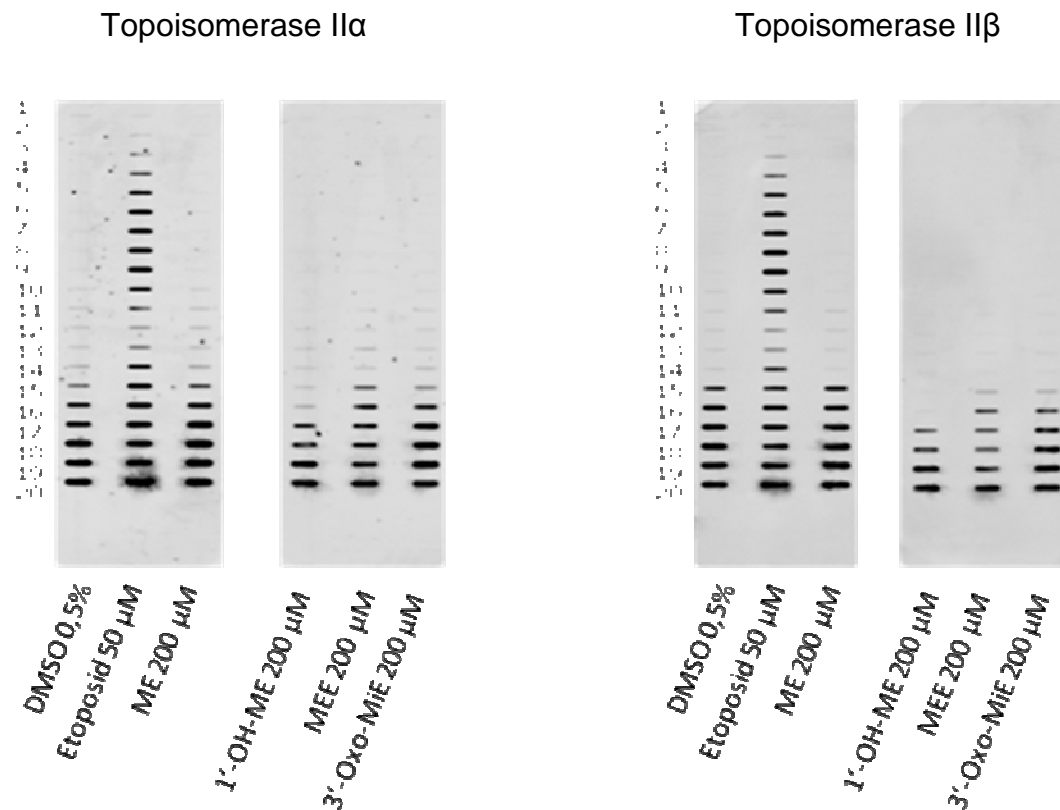


Abb.71: Effekte von Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MiE) auf die Stabilisierung des Topoisomerase-II-DNA-Komplexe in HT29 Zellen (ICE-Bioassay). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO 0,5% und als Positivkontrolle Etoposid (50  $\mu$ M) mitgeführt. Gezeigt wird ein repräsentativer Immunoblot von drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

Methyleugenol und der Hauptmetabolit 1'-Hydroxymethylisoeugenol zeigten im Relaxationsassay keine Wirkung auf die rekombinante Topoisomerase I. Methyleugenol-2',3'-epoxid zeigte im Relaxationsassay einen Hemmeffekt auf die Topoisomerase I in der höchsten getesteten Konzentration von 200  $\mu\text{M}$ . In einem zellulären Testsystem wird diese Konzentration jedoch keine Relevanz haben, da in dieser Konzentration zytotoxische Effekte eine Rolle spielen würden [Groh *et al.*, 2012]. Der oxidative Metabolit 3'-Oxomethylisoeugenol hemmte im zellfreien Testsystem in bereits sehr niedrigen Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$  die Aktivität der rekombinanten Topoisomerase I. Keine der Substanzen wies eine Hemmwirkung auf die Aktivität rekombinanter Topoisomerase II auf, wobei in dem gewählten Testsystem (Dekatenierungsassay) nicht zwischen einer potentiellen Wirkung auf die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form unterschieden werden konnte. Insgesamt wurde im zellfreien Testsystem 3'-Oxomethylisoeugenol als hoch potenter und spezifischer Topoisomerase-I-Hemmstoff charakterisiert. Bislang ist weder Methyleugenol noch ein Metabolit als Hemmstoff für Topoisomerasen in der Literatur beschrieben. Nur für Eugenol, welches auch zur Gruppe der Alkenylbenzene zählt, wurde eine Hemmwirkung auf Topoisomerase II beschrieben [Maralhas *et al.*, 2006]. Zur Charakterisierung des Wirkmechanismus und zur Übertragung der Aktivitätsdaten in ein zelluläres Testsystem wurde der ICE-Bioassay durchgeführt. Um auszuschließen, dass auf zellulärer Ebene eine Beeinflussung der Aktivität der Topoisomerase I und II durch die Testsubstanzen stattfindet, wurde jeweils eine Konzentration exemplarisch mitgeführt. Keine der Substanzen führte zur Stabilisierung von Topoisomerase I, II $\alpha$  oder II $\beta$  DNA-Intermediats, so dass eine Wirkung als Topoisomerasegift ausgeschlossen werden kann. Die Ergebnisse aus dem Relaxationsassay und dem ICE-Bioassay deuten darauf hin, dass es sich bei 3'-Oxomethylisoeugenol um einen katalytischen Hemmstoff der Topoisomerase I handeln könnte. Katalytische Hemmstoffe interagieren mit dem Zielenzym bevor der DNA-Strang geschnitten wird und verhindern so die Entstehung des kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplexes ("Cleavage" Komplex). Hierdurch wird der wichtige Wirkmechanismus von Topoisomerasegiften, die Stabilisierung des Cleavage-Komplexes, verhindert oder stark vermindert. Ein katalytischer Hemmstoff übt damit eine gewisse Schutzwirkung gegenüber Topoisomerasegiften aus. Zur Bestätigung der These, dass es sich bei 3'-Oxomethylisoeugenol um einen katalytischen Hemmstoff handelt, wird sowohl die Einzelzellgelelektrophorese als auch der ICE-Bioassay mit Vor- und Co-Inkubation

durchgeführt. In der Einzelzellgelelektrophorese werden die HT29 Zellen zunächst für 30 Minuten oder im Langzeitversuch für 23 Stunden mit 3'-Oxomethylisoeugenol inkubiert. Anschließend erfolgt für eine Stunde die Co-Inkubation mit dem Topoisomerasegift Camptothecin (100  $\mu$ M). Handelt es sich bei 3'-Oxomethylisoeugenol um einen rein katalytischen Hemmstoff, so wird sich die DNA-strangbrechende Wirkung des Camptothecins, welche auf der Stabilisierung des Cleavage-Komplexes beruht, reduzieren.

Zur Prüfung der aufgestellten Hypothese wurden auch die Effekte der Muttersubstanz Methyleugenol, die keine Hemmwirkung auf die Topoisomerase-I-Aktivität aufwies, auf die DNA-strangbrechende Wirkung des Topoisomerase-I-Giftes Camptothecin untersucht. Camptothecin zeigte in der Einzelzellgelelektrophorese eine Schweifintensität, welche als Maß für die DNA-strangbrechende Wirkung steht, von etwa 14%. Wie erwartet, hat die Vor- und Co-Inkubation mit Methyleugenol (1 – 100  $\mu$ M) keine Reduzierung der DNA-strangbrechenden Wirkung des Camptothecin (100  $\mu$ M) zur Folge (Abb.72).

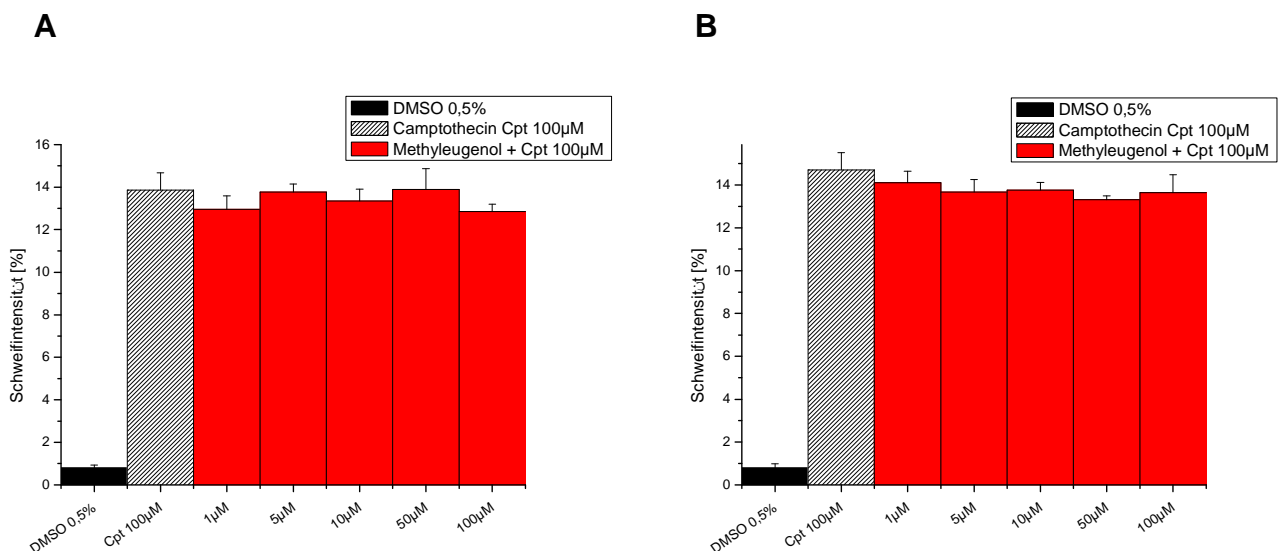


Abb.72: Induktion von DNA-Strangbrüchen nach Prä- und Coinkubation mit Methyleugenol (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M und 100 $\mu$ M) für 30 Minuten (A) und 23 Stunden (B) sowie anschließender einstündiger Coinkubation mit Camptothecin (CPT, 100  $\mu$ M), Lösungsmittelkontrolle (0,5% DMSO, 10% FKS) an HT29 Zellen; abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; n = 3 in einer Doppelbestimmung.

3'-Oxomethylisoeugenol zeigte bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  und der 30-minütigen Präinkubation eine signifikante Hemmung der DNA-schädigenden Wirkung des Camptothecins (Abb.73A). Dieser Effekt deutet daraufhin, dass 3'-Oxomethylisoeugenol die Stabilisierung des Topoisomerase-DNA-Intermediats, welches zur DNA-schädigenden Wirkung des Camptothecins führt, vermindert bzw. in hohen Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$  verhindert. So liegt die Schweifintensität von Camptothecin (100  $\mu\text{M}$ ) ohne Präinkubation mit 3'-Oxomethylisoeugenol bei etwa 14%. Wird jedoch zuvor 30 Minuten mit 3'-Oxomethylisoeugenol inkubiert, so sinkt die Schweifintensität dosisabhängig auf etwa 4% in der höchsten getesteten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  3'-Oxomethylisoeugenol. In der Langzeitinkubation (23 Stunden) mit 3'-Oxomethylisoeugenol und anschließender Coinkubation mit Camptothecin konnte zwar auch ein Rückgang der DNA-strangbrechenden Wirkung des Topoisomerasegiftes beobachtet werden, jedoch wurde nur in der höchsten getesteten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  3'-Oxomethylisoeugenol eine signifikante Reduzierung der DNA-schädigenden Wirkung festgestellt (Abb.73B). Dieser Effekt lässt sich vermutlich auf die signifikante DNA-strangbrechende Wirkung von 3'-Oxomethylisoeugenol in Konzentrationen  $\geq 25 \mu\text{M}$  zurückführen (Abb.55).

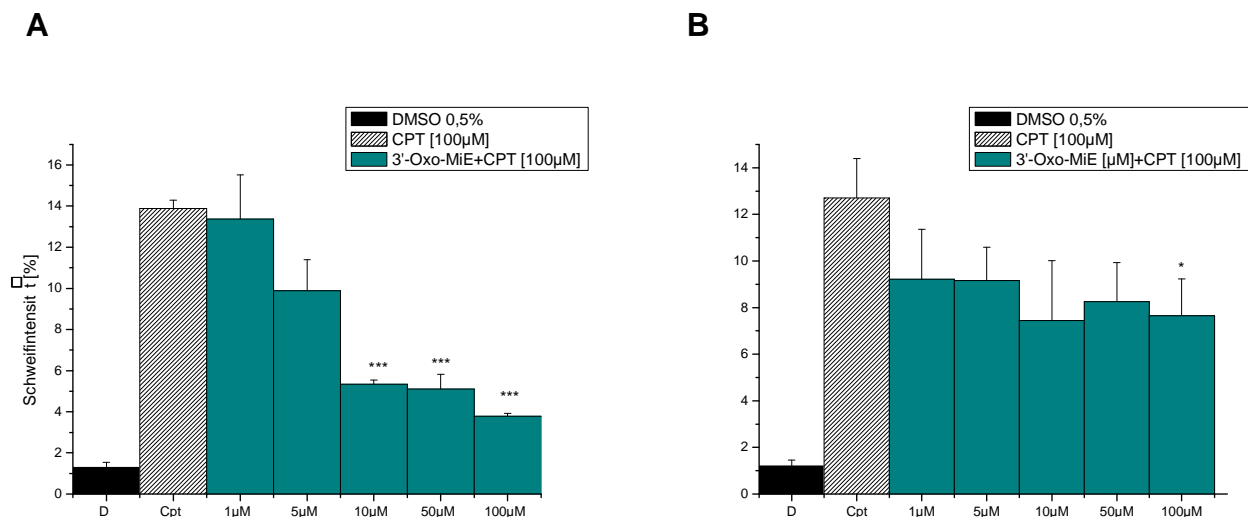


Abb.73: Induktion von DNA-Strangbrüchen nach Prä- und Coinkubation mit 3'-Oxomethylisoeugenol (1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100 $\mu\text{M}$ ) für 30 Minuten (A) und 23 Stunden (B) sowie anschließender einstündiger Coinkubation mit Camptothecin (CPT, 100  $\mu\text{M}$ ), Lösungsmittelkontrolle (0,5% DMSO, 10% FKS) an HT29 Zellen; abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; n = 3 in einer Doppelbestimmung. \* Signifikanzen bezogen auf die Positivkontrolle Camptothecin (CPT, 100  $\mu\text{M}$ ); Student's t Test, \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .



Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass es sich bei 3'-Oxomethylisoeugenol um einen katalytischen Hemmstoff der Topoisomerase I handelt, da die DNA-schädigende Wirkung des Topoisomerasegiftes Camptothecin durch die Vorinkubation mit 3'-Oxomethylisoeugenol signifikant reduziert wird. Um diese Hypothese weiter zu untermauern, wurde der ICE-Bioassay mit Prä- und Coinkubation mit Camptothecin (100  $\mu$ M) durchgeführt. Hierzu wurden die HT29 Zellen zunächst für 30 Minuten mit der Testsubstanz inkubiert und anschließend erfolgte eine Coinkubation mit dem Topoisomerasegift Camptothecin. Danach wurde der ICE-Bioassay mit Antikörpern gegen Topoisomerase I wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Zum Vergleich wurde erneut die Muttersubstanz Methyleugenol mitgeführt. Methyleugenol zeigte keine Beeinflussung auf die Camptothecin/Topoisomerase-I/DNA-Interaktion in Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  (Abb.74).

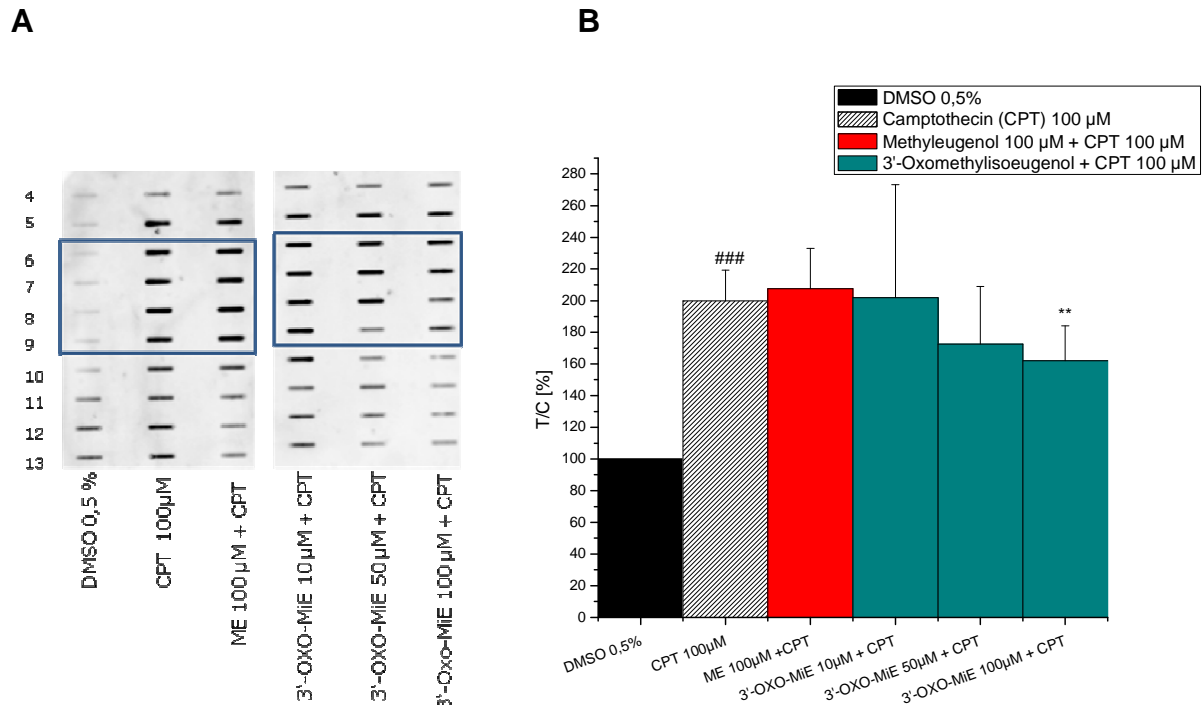


Abb.74: Einfluss von Methyleugenol (ME) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MiE) auf die Rate an Camptothecin (CPT) induzierte Topoisomerase-I/DNA-Komplexe. Die HT29 Zellen wurden für 30 Minuten mit Methyleugenol oder 3'-Oxomethylisoeugenol präinkubiert, danach erfolgte eine Coinkubation für 1 Stunde mit Camptothecin (CPT, 100  $\mu\text{M}$ ). A) Repräsentativer Immunoblot von drei unabhängigen Experimenten. B) Der Status an Topoisomerase-I-DNA-Intermediaten wurde kalkuliert als co-inkubierte Zellen über CPT behandelte Zellen mit Berücksichtigung des DNA-Gehalts x 100 (T/C, %). Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung; n = 3. \* Signifikanzen bezogen auf die Positivkontrolle Camptothecin (CPT, 100  $\mu\text{M}$ ); Student's *t* Test: \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; # Signifikanzen bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO; 0,5%); Student's *t* Test: ### =  $p < 0,001$ .

3'-Oxomethylisoeugenol zeigte jedoch eine Hemmung der Stabilisierung des Topoisomerase-DNA-Komplexes durch Camptothecin in Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$ . In der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  3'-Oxomethylisoeugenol ist eine signifikante Hemmung der Camptothecin-vermittelten Topoisomerasegiftung zu beobachten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es sich bei 3'-Oxomethylisoeugenol um einen katalytischen Hemmstoff der Topoisomerase I handelt. 3'-Oxomethylisoeugenol scheint eine gewisse Schutzwirkung vor Topoisomerasegiften wie Camptothecin zu zeigen, da die Verbindung mit dem Zielenzym interagiert bevor der Topoisomerase-DNA-Komplex ausgebildet wird. Dies wurde sowohl bei der Hemmung der DNA-schädigenden Wirkung des Camptothecins nach Vorinkubation mit 3'-Oxomethylisoeugenol als auch bei dem ICE-Bioassay mit Prä- und Coinkubation deutlich, wobei der Hemmeffekt auf die DNA-strangbrechende Wirkung stärker war als die Verminderung Camptothecin-induzierter Topoisomerase-I/DNA-Intermediate. Potentielle weitere Interaktion wie z.B. verminderte Aufnahme von Camptothecin in die Zelle oder verstärkte Metabolisierung könnten auch eine Rolle spielen.

Diese Beeinflussung der Topoisomerase kann eine mögliche Begründung für die beobachtete DNA-schädigende Wirkung dieses Metaboliten sein. Weiter wurde nachgewiesen, dass die Inkubation der HT29 Zellen mit 3'-Oxomethylisoeugenol eine Arretierung in der G<sub>2</sub>/M-Phase bewirkt. Dieser beobachtete Effekt kann mit der katalytischen Inhibierung der Topoisomerase I zusammenhängen. In der Literatur wurde bereits von einem Arrest in der G<sub>2</sub>/M-Phase durch Topoisomerase-I-Inhibitoren berichtet [Liu *et al.*, 2013; Montariello *et al.*, 2013]. Auf Grund von Torsionstress durch die Hemmung der Topoisomerase I kann es zu unspezifischen DNA-Strangbrüchen kommen, welche vor der Einleitung der Mitose repariert werden müssen. Dadurch kann es zu einer Verlängerung/ Arretierung der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase kommen [Pommier, 2013; Pommier *et al.*, 2010; Pommier, 2009]. Durch die Entstehung von DNA-Strangbrüchen, insbesondere Doppelstrangbrüche, werden im Folgenden zur Untersuchung der Wirkmechanismen der Gentoxizität von Methyleugenol und den Metaboliten sowohl der Surrogatmarker für DNA-Doppelstrangbrüche  $\gamma$ H2AX (Kap. 5.5) als auch weitere DNA-Schaden-assoziierte Signalkaskaden (Kap. 5.6) untersucht.

## **5.5 Untersuchung der Beeinflussung der $\gamma$ H2AX-Expression**

H2AX ist eine Variante der Histon H2A Familie. Die Phosphorylierung von H2AX ( $\gamma$ H2AX) wird durch die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen ausgelöst und stellt einen Surrogatmarker für genotoxische zelluläre Ereignisse dar [Bonner *et al.*, 2008; Dickey *et al.*, 2009; Watters *et al.*, 2009; Mah *et al.*, 2010]. Einer der ersten Hinweise auf Doppelstrangbrüche ist die Phosphorylierung des Serin 139 am Histon H2AX durch ATM und ATR Kinasen und folglich die schnelle Bildung von  $\gamma$ H2AX "Foci" an den DNA-Doppelstrangbrüchen [Redon *et al.*, 2002]. Dies ist wichtig für die Rekrutierung von Reparaturfaktoren und die Aktivierung von Kontrollpunkten im Zellzyklus [Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002]. Um herauszufinden, ob es sich bei den beobachteten DNA-Schäden nach Inkubation mit Methyleugenol und den oxidativen Metaboliten um DNA-Doppelstrangbrüche handelt, wurde mittels Western Blot Analysen die Expression von  $\gamma$ H2AX in HT29 Zellen gemessen.

Nach 24-stündiger Inkubation mit 100  $\mu$ M Methyleugenol wurde ein marginaler Anstieg der  $\gamma$ H2AX Expression detektiert, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb.75). Die Metaboliten hingegen zeigten eine signifikante dosisabhängige Erhöhung der  $\gamma$ H2AX Expression in HT29 Zellen (Abb.75). 1'-Hydroxymethyleugenol zeigte die stärkste Potenz zur Bildung von  $\gamma$ H2AX. Hier wurde bereits in einer Konzentration von 50  $\mu$ M eine signifikante Erhöhung des  $\gamma$ H2AX Proteinstatus detektiert. Die Metaboliten Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol wiesen in einer Konzentration von 100  $\mu$ M einen signifikanten Effekt auf die  $\gamma$ H2AX Expression auf.

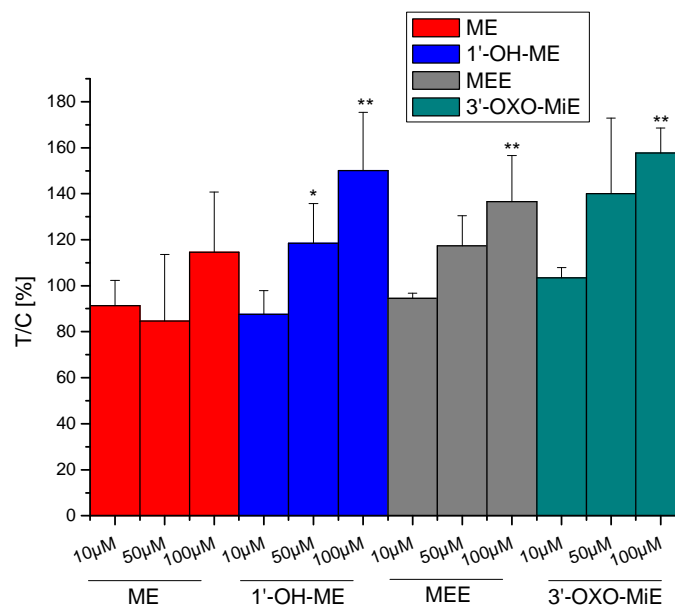
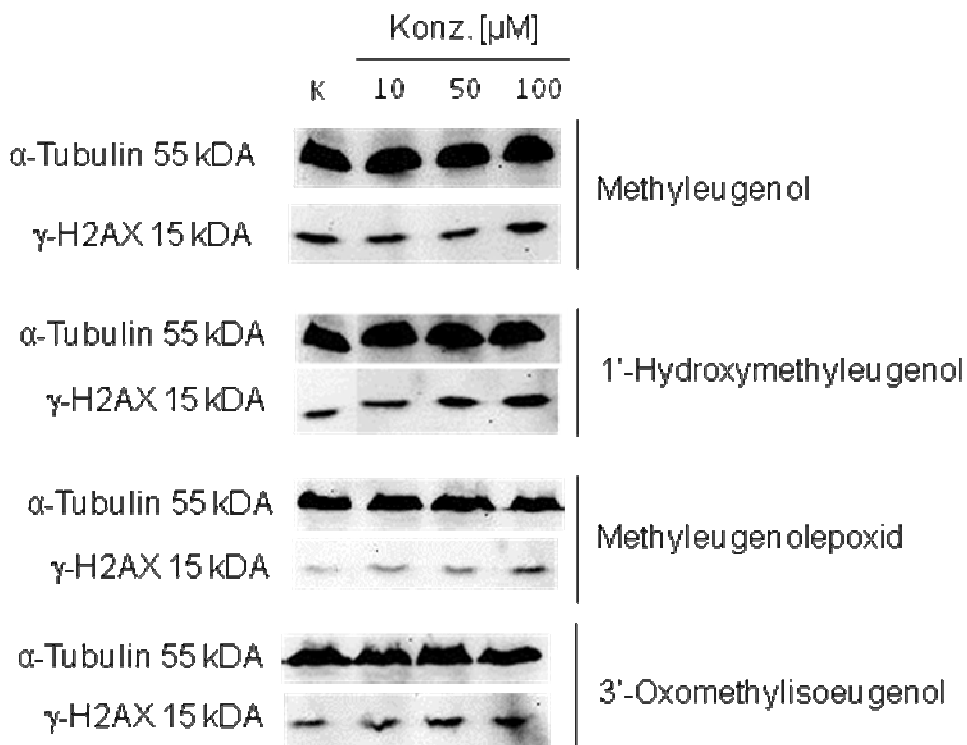
**A****B**

Abb.75: (A) Proteinstatus von  $\gamma$ H2AX nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MiE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. Student's *t* Test: \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ . (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%)

In HT29 Zellen führte eine 24-stündige Inkubation mit Methyleugenol in der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Steigerung der DNA-Strangbruchrate. Sie stützen somit die Ergebnisse der  $\gamma\text{H2AX}$ -Expression, da auch nur in der höchsten Konzentration ein erhöhtes Maß an DNA-Doppelstrangbrüchen festgestellt wurde, welches sich jedoch als nicht statistisch signifikant erwies. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zumindest ein Teil der in der Einzelzellgelelektrophorese detektierten Methyleugenol-induzierten DNA-Strangbrüche auf DNA-Doppelstrangbrüche zurückzuführen sind, wobei der Mechanismus der DNA-Schädigung durch Methyleugenol noch nicht vollständig charakterisiert ist, da ein Beitrag der in dieser Arbeit untersuchten Zielenzyme (Topoisomerasen, HDAC) ausgeschlossen werden kann. Eine weitere Erklärung für die nicht signifikante Erhöhung an DNA-Doppelstrangbrüchen könnte die Dauer der Methyleugenolinkubation darstellen. In anderen Arbeiten wurde die Expression von  $\gamma\text{H2AX}$  bereits nach einer Stunde bis nach maximal acht Stunden untersucht [Yun *et al.*, 2012; Kalfalah *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013]. Es ist damit möglich, dass sich die posttranslationale Modifikation des H2AX Histons verändert hat und damit kein signifikanter Anstieg der Expression von  $\gamma\text{H2AX}$  zu messen war.

1'-Hydroxymethyleugenol, der auch in der Literatur als gentoxisch beschrieben wurde [Jeurissen *et al.*, 2006; Groh *et al.*, 2012], induzierte nach 24 Stunden signifikant die  $\gamma\text{H2AX}$  Expression und damit die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$ . Die posttranslationale Modifizierung von H2AX stellt damit einen möglichen Wirkmechanismus für die beobachteten DNA-Schäden durch 1'-Hydroxymethyleugenol dar. DNA-Doppelstrangbrüche können im Vergleich zu Einzelstrangbrüchen nur sehr schwer repariert werden. Die Schwierigkeit der Reparatur eines Doppelstrangs liegt zum einen darin, dass es zu einem Verlust der komplementären Stränge kommen kann, wobei hier die erneute Herstellung der genetischen Information erschwert wird. Zum anderen stellt die räumliche Separation der beiden freigesetzten DNA-Enden eine Erschwerung der möglichen Reparatur dar. Ist die Reparatur fehlerhaft oder erfolgt keine Reparatur, so können durch chromosomale Veränderungen wie Translokationen, Inversionen und Deletionen Chromosomenabberationen entstehen, die eine Tumorentstehung begünstigen [Hoeijmakers, 2001; Van Gent *et al.*, 2001; Obe *et al.*, 1992; Khanna und Jackson, 2001]. So wurde Methyleugenol insbesondere wegen der Metabolisierung zum reaktiven 1'-Hydroxymethyleugenol als gentoxisches Kanzerogen klassifiziert [SCF,

2001]. In der Literatur wurden intrachromosomale Kombinationen nach Inkubation mit Methyleugenol an Hefen beschrieben [Schiestl *et al.*, 1989]. Hingegen gibt es bislang keine Hinweise auf Chromosomenabberationen, die durch 1'-Hydroxymethyleugenol verursacht werden. Jedoch können möglicherweise die Doppelstrangbrüche zum gentoxischen Potential beitragen.

Die anderen beiden Metaboliten Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol zeigten auch eine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen. Auch hier könnte die Expression von  $\gamma$ H2AX ein möglicher Wirkmechanismus der DNA-strangbrechenden Wirkung darstellen. 3'-Oxomethylisoeugenol zeigte sich zu dem als katalytischer Topoisomerase-I-Hemmstoff, der durch starke Torsionsspannung unspezifische DNA-Strangbrüche induzieren kann [Roca, 2011; Bächler *et al.*, 2014; Teves und Henikoff, 2014]. Es konnte jedoch bei keiner der Substanzen eine Beeinflussung der Topoisomerase II festgestellt werden. Topoisomerase II induziert im Gegensatz zur Topoisomerase I DNA-Doppelstrangbrüche. Aus diesem Grund kann dieser Wirkmechanismus als mögliche Induzierung von DNA-Doppelstrangbrüchen ausgeschlossen werden. Auch die Hemmung der HDAC-Aktivität durch die beiden Metabolite kann im Zusammenhang mit dem Anstieg der Expression von  $\gamma$ H2AX stehen. Klasse I, II und III HDACs stehen in Verbindung mit der DNA-Schadensantwort, homologen Rekombination und der Chromatin Integrität [Rajendran *et al.*, 2011]. Es wurde gezeigt, dass HDAC 1 eine Rolle bei der Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen spielt. In Studien mit Zellen, denen HDAC 1 nicht exprimiert wurde, wurde gezeigt, dass die Zellen hypersensitiv gegenüber DNA-schädigenden Substanzen sind und dass sie Defekte in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zeigen [Miller *et al.*, 2010]. In einer Studie von Saldanha *et al.* wurde ebenfalls gezeigt, dass eine Verminderung der HDAC-Aktivität mit einem Anstieg der Expression von  $\gamma$ H2AX in Verbindung steht. So konnte nachgewiesen werden, dass nach Inkubation mit EGCG und Natriumbutyrat der HDAC 1 Status abnahm sowie die Expression von  $\gamma$ H2AX zunahm und dies in Verbindung steht mit einer Zunahme an DNA-Schäden bzw. mit einer Verbindung der replikativen Kapazität [Saldanha *et al.*, 2014]. Ebenso wurde in einer Studie von Rajendran *et al.* gezeigt, dass nach Inkubation mit Isothiocyanaten die HDAC-Aktivität abnahm und die Expression von  $\gamma$ H2AX in Kolonkrebszellen zunahm [Rajendran *et al.*, 2013]. So stimmen diese Studienergebnisse mit den Resultaten der Literatur überein. Es wurde auch in dieser Arbeit eine Hemmung der HDAC-

Aktivität nach Inkubation mit Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol detektiert, welche möglicherweise im Zusammenhang mit Fehlern in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen stehen könnten. Dies würde die vermehrte Expression von  $\gamma$ H2AX nach Inkubation mit diesen Metaboliten begründen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Anstieg der Expression von  $\gamma$ H2AX und das damit verbundene Vorliegen von DNA-Doppelstrangbrüchen ein möglicher Wirkmechanismus für die gentoxische Wirkung der Metabolite von Methyleugenol darstellt.



## **5.6 Beeinflussung DNA-Schaden-assoziiierter Signalkaskaden**

Der Zellzyklus ist die Grundlage für Wachstum und Entwicklung für alle lebenden Organismen. In Eukaryoten sind Kontrollpunkte zur Erkennung von DNA-Schäden in die Regulation des Zellzyklus eingebaut. Diese schützen die genomische Integrität, da Proteinkinasen wie ATM und ATR durch eine vorliegende DNA-Schädigung vor allem durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert und im Verlauf der ATM/ATR-Signalkaskade DNA-Reparaturenzyme verstärkt exprimiert werden. Die Phosphorylierung von ATM und ATR wird daher als weiterer Biomarker für eine DNA-schädigende Wirkung verwendet [Kastan und Lim, 2000; Motoyama und Naka, 2004]. Im Verlauf der Signalkaskade werden CHK1 und CHK2 Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert [Shiloh, 2003]. Diese Kinasen führen dann weiter zur Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 oder dem DNA-Reparaturprotein BRCA1. Durch Aktivierung dieser Signalkaskade kann der Zellzyklusverlauf am Übergang von der G<sub>1</sub> in die S-Phase oder von G<sub>2</sub> in die M-Phase gestoppt werden, so dass die Zelle den DNA-Schaden reparieren oder den programmierten Zelltod einleiten kann (Abb.76) [Kastan und Lim, 2000].

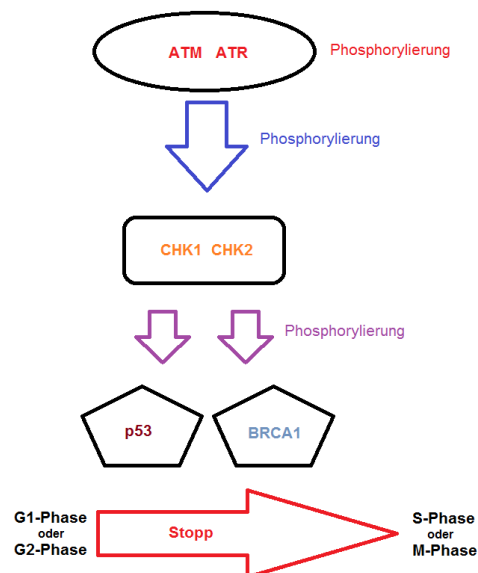


Abb.76: Verlauf der ATM/ATR-Signalkaskade

Phosphorylierung von ATM und ATR führt zur Aktivierung und Phosphorylierung von CHK1 und CHK2. Dies wiederum führt zur Phosphorylierung von p53 und BRCA1. Dadurch kann der Zellzyklusverlauf am Übergang von der G1 Phase in die S-Phase oder von G2 in die M-Phase gestoppt werden.

Auf Grund der beobachteten DNA-Schäden nach 24-stündiger Inkubation der HT29 Zellen mit Methyleugenol und den oxidativen Metaboliten sowie der gezeigten G<sub>2</sub>-Arretierung wurde die Expression phosphorylierter ATM und ATR Kinasen mittels Western Blot Analyse mit Antikörper gegen phospho-ATM (Ser1981) und phospho-ATR (Ser428) untersucht.

Nach 24-stündiger Inkubation der HT29 Zellen mit Methyleugenol und den drei ausgewählten oxidativen Metaboliten zeigte sich keine Änderung der Expression von phospho-ATR und phospho-ATM (Abb.77 und Abb.78).

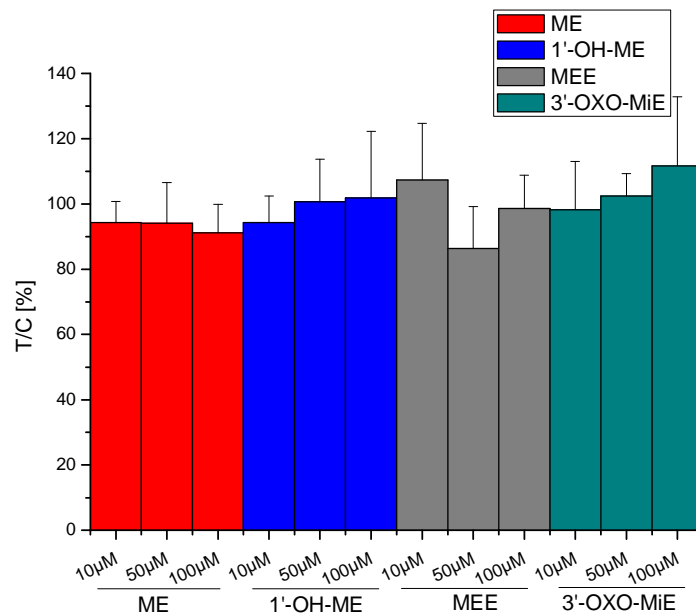
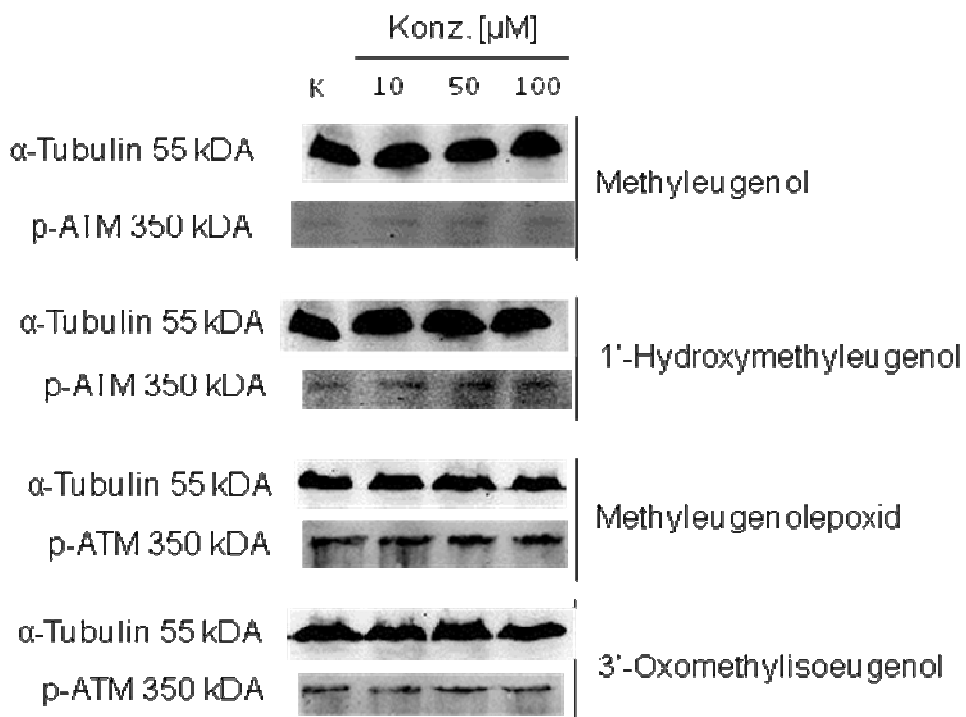
**A****B**

Abb. 77: (A) Proteinstatus von phospho-ATM (p-ATM) nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MiE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%).

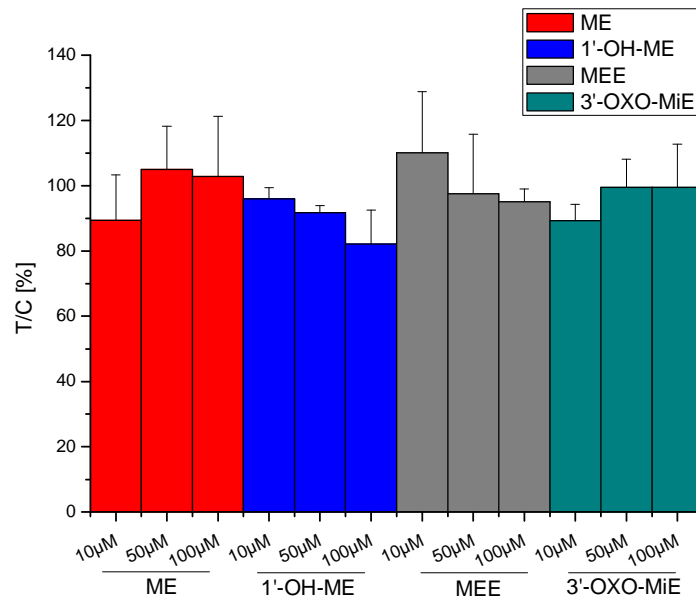
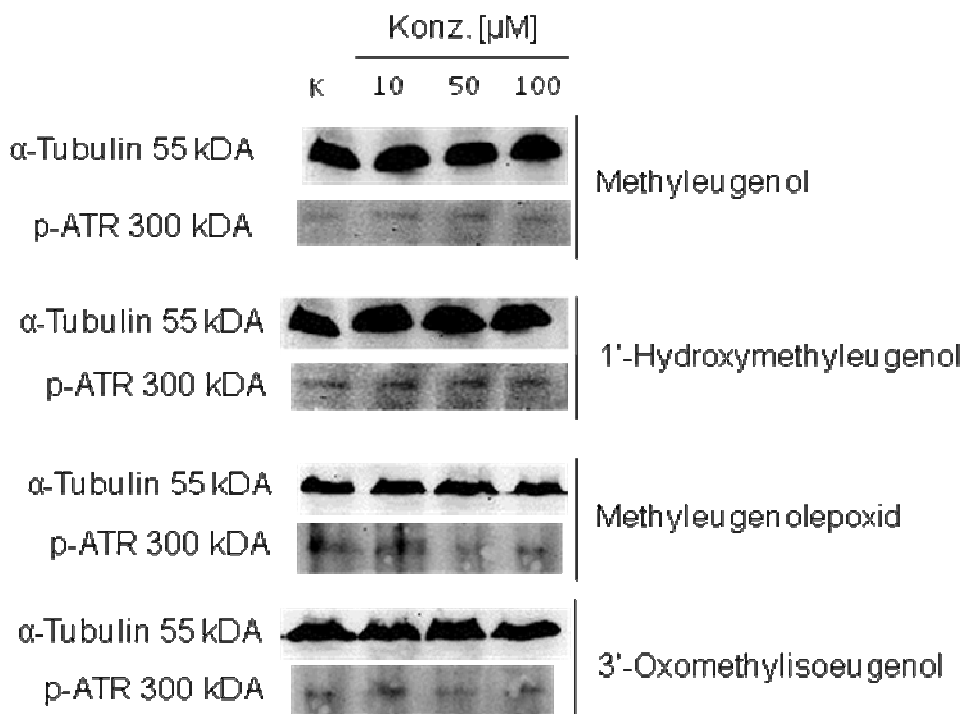
**A****B**

Abb.78: (A) Proteinstatus von phospho-ATR (p-ATR) nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MIE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%).

Da nach 24-stündiger Inkubation kein Effekt auf die Expression der Kinasen phospho-ATR und phospho-ATM zu erkennen war, wurde die Expression dieser Proteine nach zweistündiger Inkubation mit den Testsubstanzen gemessen. In der Literatur wurde bislang ein kürzeres Zeitfenster zur Messung der Expression von phospho-ATM und phospho-ATR gewählt, da eine schnelle Aktivierung der Kinasen nach Induktion von DNA-Strangbrüchen möglich ist [Palii *et al.* 2013; Yun *et al.*, 2012]. Hier zeigte sich nach zweistündiger Inkubation mit Methyleugenol sowohl für die Expression von phospho-ATM als auch für phospho-ATR ein marginaler Anstieg des Proteinstatus, jedoch wurde kein Signifikanzniveau für phospho-ATM erreicht. In der höchsten Konzentration von 100  $\mu$ M Methyleugenol wurde eine signifikante Zunahme der phospho-ATR Expression detektiert (Abb.79 und Abb.80).

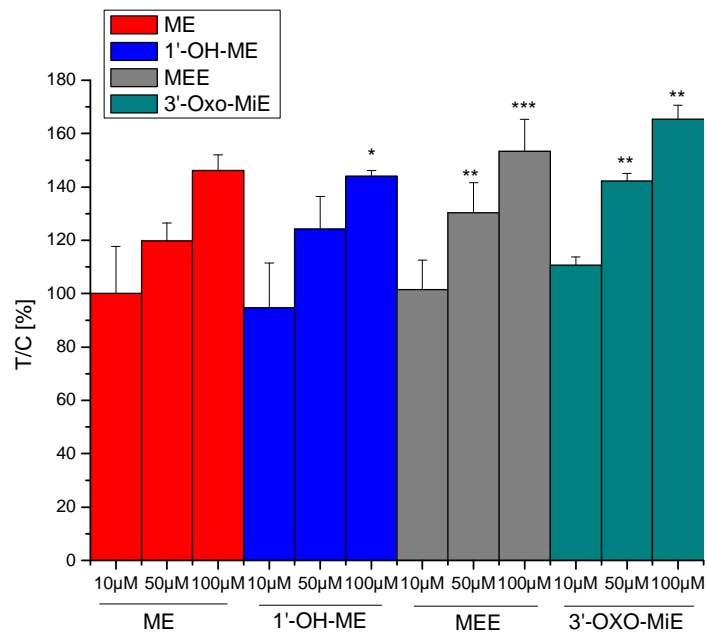
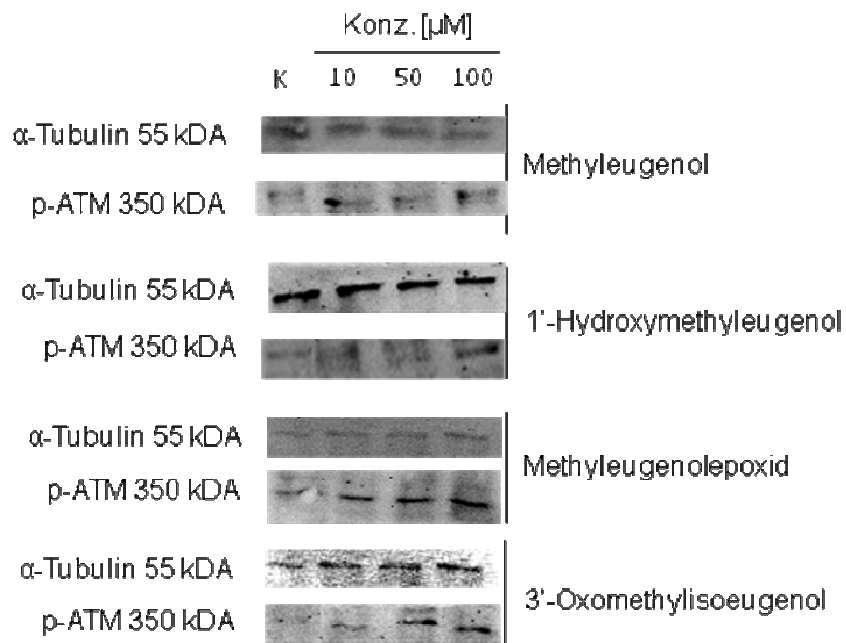
**A****B**

Abb.79: (A) Proteinstatus von phospho-ATM (p-ATM) nach zweistündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MiE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%).

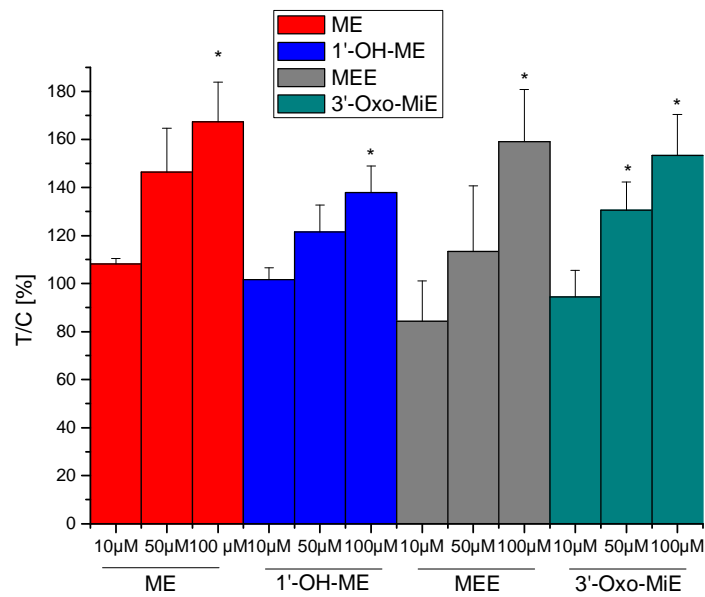
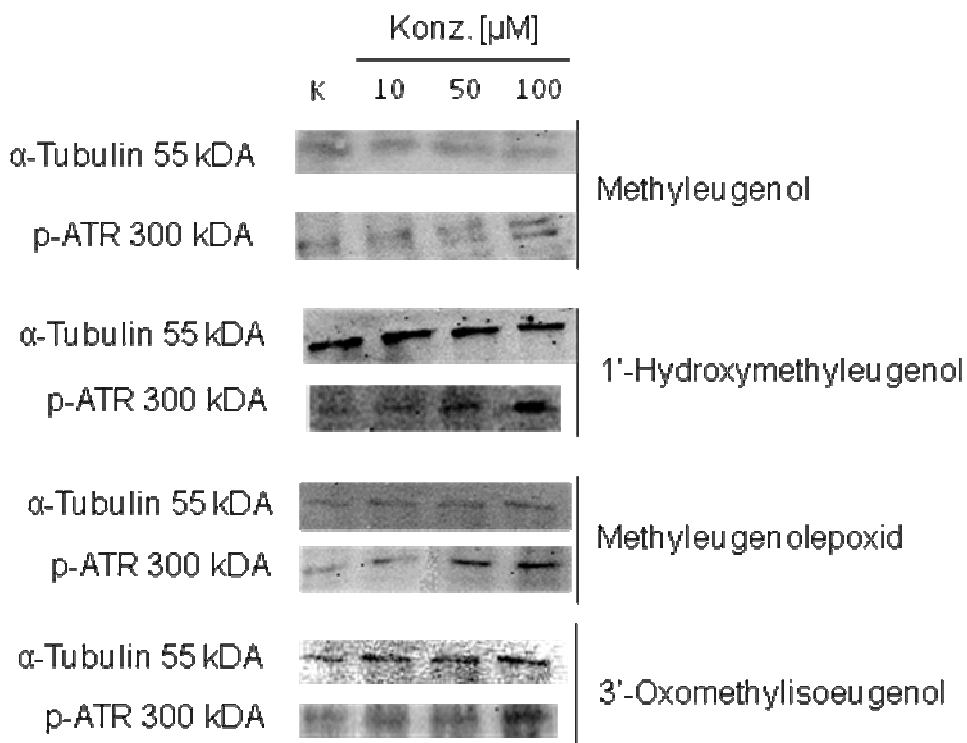
**A****B**

Abb.80: (A) Proteinstatus von phospho-ATR (p-ATR) nach zweistündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MiE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%).

Nach der Kurzzeitinkubation mit 1'-Hydroxymethyleugenol zeigte sich ein marginaler dosisabhängiger Anstieg der Expression von phospho-ATM und phospho-ATR (Abb.79 und Abb.80). In der jeweilig höchsten Konzentration von 100  $\mu$ M konnte eine signifikante Zunahme des Phosphorylierungsstatus der Kinasen detektiert werden.

Methyleugenol-2',3'-epoxid induzierte einen Anstieg der phospho-ATM und phospho-ATR Expression, wobei eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung zu erkennen ist (Abb.79 und Abb.80). In Konzentrationen  $\geq 50$   $\mu$ M konnte eine signifikante Zunahme des phospho-ATM-Proteinstatus festgestellt werden und der Phosphorylierungsstatus von ATR wurde in der höchsten Konzentration von 100  $\mu$ M Methyleugenol-2',3'-epoxid signifikant erhöht.

Ebenso bewirkte die Kurzzeitinkubation mit 3'-Oxomethylisoeugenol eine Änderung des Proteinstatus von phospho-ATM und phospho-ATR (Abb.79 und Abb.80). Auch hier ist ein Dosis-Wirkungsverlauf sichtbar. In Konzentrationen  $\geq 50$   $\mu$ M konnte sowohl eine signifikante Zunahme der Expression von phosphoryliertem ATM und ATR nachgewiesen werden.

Anschließend wurde die Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus der Kontrollpunktkinasen CHK1 (Ser 345) und CHK2 (Thr 68) mittels Western Blot Analyse nach 24-stündiger Inkubation der HT29 Zellen mit den Testsubstanzen bestimmt. Nach Inkubation mit Methyleugenol wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg an phosphorylierter CHK1 detektiert, jedoch ohne Erreichen eines Signifikanzniveaus (Abb.81). 1'-Hydroxymethyleugenol induzierte in einer Konzentration von 100  $\mu$ M signifikant die Expression an phosphorylierter Kinase CHK1 (Abb.81). Methyleugenol-2',3'-epoxid beeinflusste den Phosphorylierungsstatus von CHK1; es ist eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung zu erkennen. Das erste Signifikanzniveau konnte bereits nach 50  $\mu$ M Methyleugenol-2',3'-epoxid erreicht werden (Abb.81). Auch der dritte getestete oxidative Metabolit 3'-Oxomethylisoeugenol zeigte nach 24-stündiger Inkubation einen Effekt auf die Expression an phosphorylierter CHK1. Es ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Phosphorylierungsstatus von CHK1 erkennbar, welcher sich in der höchsten Konzentration von 100  $\mu$ M als signifikant erwies (Abb.81).



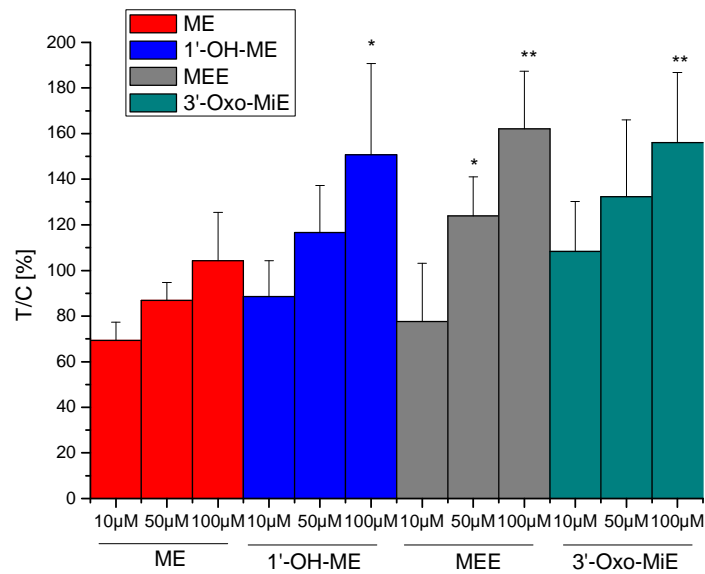
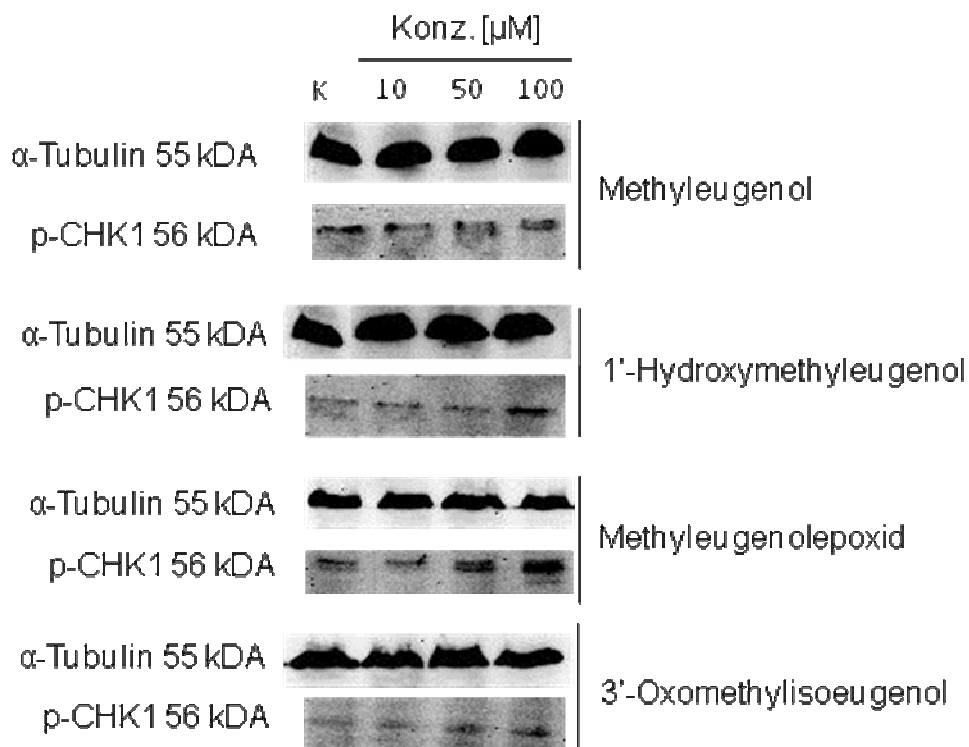
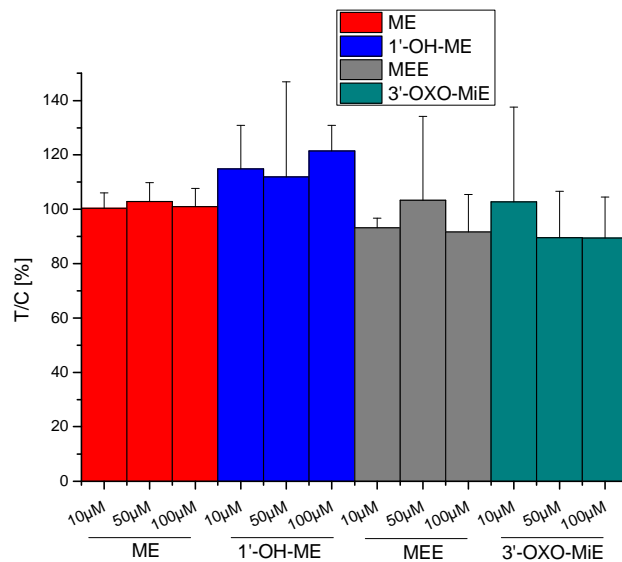
**A****B**

Abb.81: (A) Proteinstatus von phospho-CHK1 (p-CHK1) nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MiE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%).

Im weiteren Verlauf wurde auch die Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von CHK2 (Thr 68) durch Methyleugenol und die Metabolite nach 24-stündiger Inkubation an HT29 Zellen untersucht. Jedoch zeigte weder die Muttersubstanz noch einer der Metabolite einen Effekt auf die Expression von phospho-CHK2 (Abb.82).

**A**



**B**

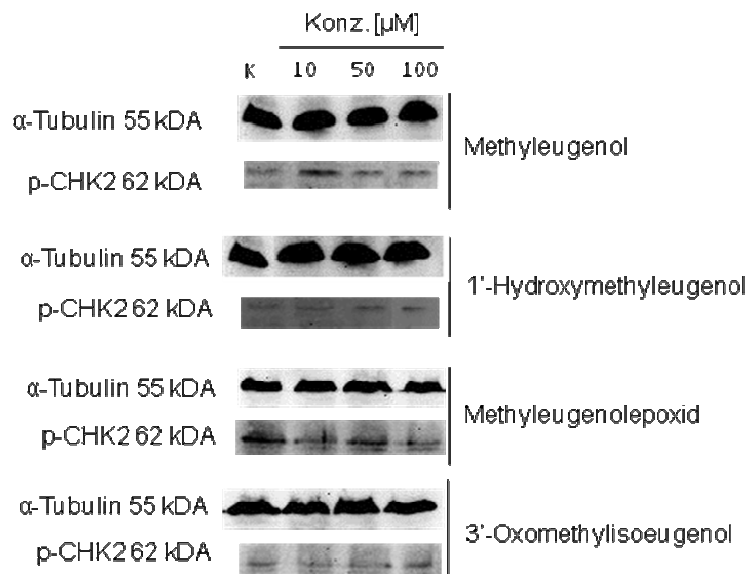


Abb.82: (A) Proteinstatus von phospho-CHK2 (p-CHK2) nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MiE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von α-Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%).

Als weiteres potentiellles Zielenzym der Signaltransduktionskaskade wurde der Phosphorylierungsstatus des Tumorsuppressorproteins p53 mittels Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen phospho-p53 (Ser15) untersucht. Hier zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol an HT29 Zellen keine Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von p53 (Abb.83). Anders zeigte sich die Wirkung auf phospho-p53 nach Inkubation mit 1'-Hydroxymethyleugenol (Abb.83). Es wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg des phosphorylierten p53 Proteins detektiert. In Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$  führte die Inkubation mit 1'-Hydroxymethyleugenol zu einem signifikanten Anstieg der Expression von phospho-p53. Nach Inkubation mit Methyleugenol-2',3'-epoxid zeigte sich auch bereits in Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$  ein signifikanter Anstieg des phosphorylierten p53 Proteins (Abb.83). 3'-Oxomethylisoeugenol in einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  erhöhte signifikant den Proteinstatus von phospho-p53 nach 24-stündiger Inkubation an HT29 Zellen (Abb.83).

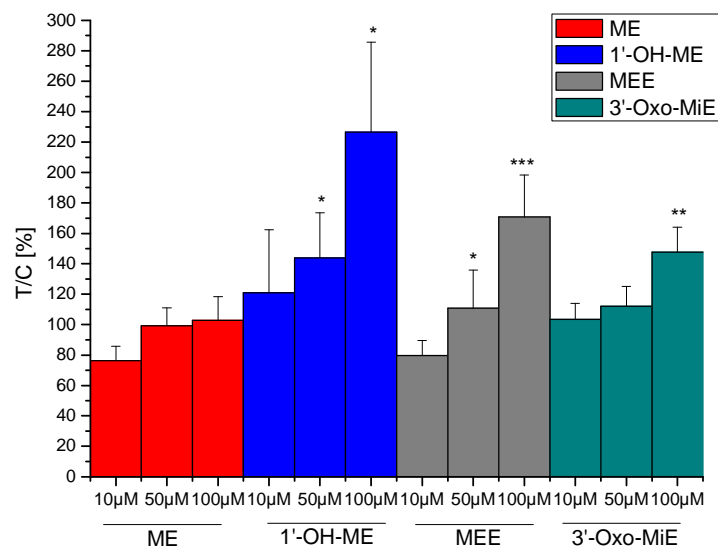
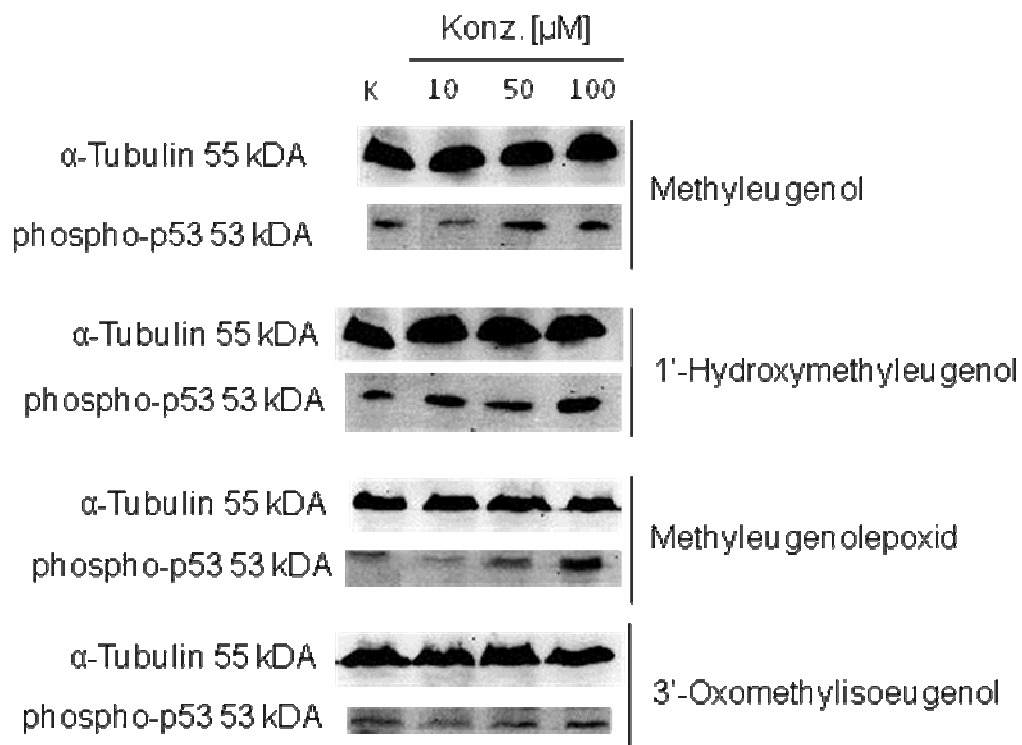
**A****B**

Abb.83: (A) Proteinstatus von phospho-p53 nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MiE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%).

Um die Daten dieser Signaltransduktionskaskade zu vervollständigen und einen möglichen Einfluss auf DNA-Reparaturmechanismen zu bekommen, wurde die Beeinflussung der Expression von BRCA1 mittels Western Blot nach 24-stündiger Inkubation an HT29 Zellen mit Methyleugenol und den oxidativen Metaboliten untersucht. Weder die Muttersubstanz Methyleugenol noch einer der Metaboliten zeigten einen Effekt auf den Proteinstatus von BRCA1 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5%) (Abb.84).

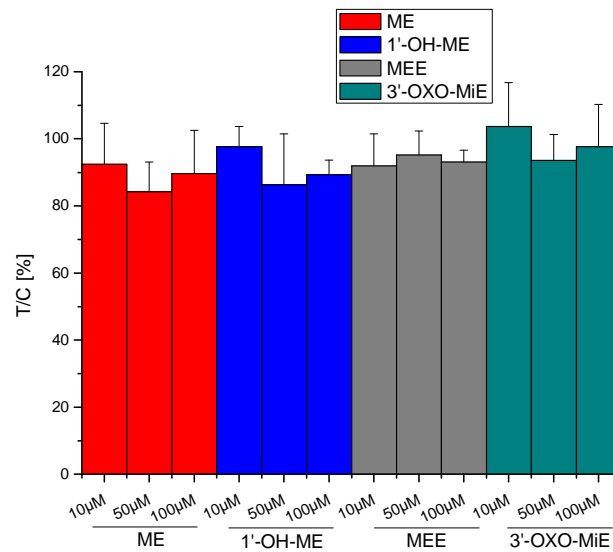
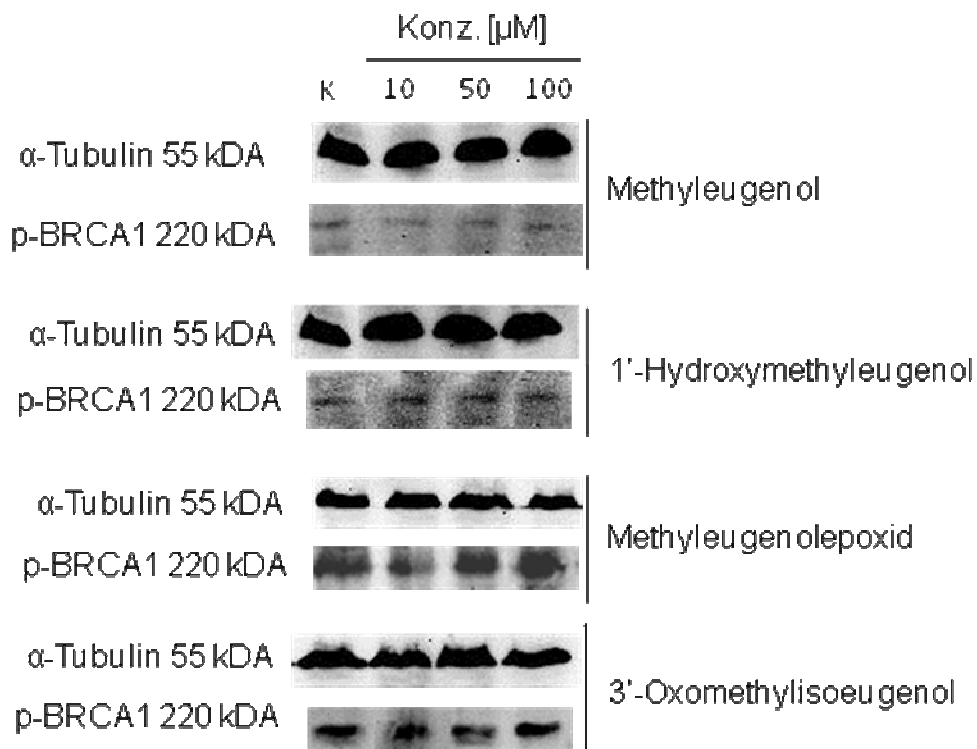
**A****B**

Abb.84: (A) Proteinstatus von phospho-BRCA1 (p-BRCA1) nach 24-stündiger Inkubation mit Methyleugenol (ME), 1'-Hydroxymethyleugenol (1'-OH-ME), Methyleugenol-2',3'-epoxid (MEE) und 3'-Oxomethylisoeugenol (3'-Oxo-MiE) gemessen mittels Western Blot Analyse. Die Daten sind bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,5% v/v) als T/C in [%] dargestellt. Die Detektion von  $\alpha$ -Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dargestellt. (B) Repräsentativer Western Blot. K, Kontrolle (DMSO, 0,5%).

Methyleugenol und die oxidativen Metabolite zeigen einen deutlichen Effekt auf die Expression der Proteine ATM und ATR nach zweistündiger Inkubation an HT29 Zellen (Abb.79 und Abb. 80). Dieses Ergebnis bestätigt die in der Einzelzellgelelektrophorese beobachtete DNA-schädigende Wirkung von Methyleugenol und den Metaboliten. So induzierten die Substanzen sowohl nach einstündiger Inkubation als auch nach 24-stündiger Inkubation DNA-Strangbrüche [Groh *et al.*, 2012]. Dies steht im Einklang mit der in dieser Arbeit beobachteten Aktivierung der ATM und ATR Kinasen. Mit Ausnahme des Metaboliten 3'-Oxomethylisoeugenol, da nach einstündiger Inkubation mit 3'-Oxomethylisoeugenol keine DNA-schädigende Wirkung detektiert wurde. Eine mögliche DNA-Schädigung nach zweistündiger Inkubation mit diesem Metaboliten müsste noch untersucht werden. Nach 24-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen ist die Erhöhung des Phosphorylierungsstatus von ATM und ATR aufgehoben, was für eine schnelle Aktivierung der Kinasen nach Induktion von DNA-Strangbrüchen spricht. So wurde bereits in der Literatur ein schneller Anstieg des Phosphorylierungsstatus (zwei Stunden) nach Behandlung von Nierenzellen (HEK Zellen) mit ionisierender Strahlung beschrieben, der nach 25 Stunden wieder auf das Kontrollniveau abfiel [Palii *et al.*, 2013].

ATR und ATM aktivieren durch Phosphorylierung an Ser-317 und Ser-345 CHK1. Aktiviertes CHK1 wiederum phosphorylieren CDC25C an Ser-217 und bilden eine Bindungsmöglichkeit für 14-3-3 Protein. Diese Interaktion mit 14-3-3 Protein verhindert die Dephosphorylierung von CDC25C und aktiviert damit den mitotischen Kinase Komplex Zyklin B-Cdc2, welcher effektiv DNA-geschädigte Zellen vor dem Eintritt in die Mitose blockiert [Motoyama und Naka, 2004]. Eine Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von CHK1 konnte nach Inkubation mit den drei Metaboliten detektiert werden (Abb.81). Jedoch induzierte keine der Testsubstanzen nach 24-stündiger Inkubation den Phosphorylierungsstatus der CHK2 Kinase (Abb. 82). Dies könnte mit der Inkubationszeit zusammenhängen, da auch hier ähnlich wie bei ATM und ATR auf Grund der Langzeitinkubation eine Dephosphorylierung stattgefunden haben könnte und somit der potentielle Effekt nach 24h nicht mehr zum Tragen käme. In einer Studie von Yun *et al.* wurde eine Zeitmessung durchgeführt. Hier zeigte sich nach 30 Minuten bzw. zwei Stunden nach Inkubation mit Widdrol ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung von CHK2, jedoch konnte nach 12 Stunden bereits ein deutlicher Rückgang beobachtet werden.

Nach 24 Stunden war es nicht mehr möglich eine Änderung der CHK2 Phosphorylierung zu detektieren [Yun *et al.*, 2012]. Eine Messung der Kurzzeitinkubation von CHK2 nach Inkubation mit Methyleugenol und den Metaboliten sollte somit in weiterführenden Studien untersucht werden. Die Beeinflussung des Proteinstatus von p53 konnte nach Inkubation mit den Metaboliten gezeigt werden (Abb.83). Dies könnte ein weiterer Hinweis sein, dass für die Untersuchung der Beeinflussung von CHK2 ein falsches Zeitfenster gewählt wurde. Weiter ist in der Literatur beschrieben, dass p53 auch über CHK1 aktiviert werden kann [Gottifredi *et al.*, 2001; Yi-Hung *et al.*, 2005; Bo *et al.*, 2014]. Dies begründet auch die p53 Aktivierung nach dem detektierten Anstieg des Phosphorylierungsstatus von CHK1. Zudem steht die Erhöhung des Phosphorylierungsstatus von p53 mit dem beobachteten G<sub>2</sub>/M-Arrest nach Inkubation mit den Testsubstanzen in Verbindung. Es wurde keine Aktivierung der DNA-Reparatur auf der Ebene von BRCA1 detektiert (Abb.84). Jedoch wurde die Induktion der Apoptose durch die Metabolite beobachtet [Ates, Diplomarbeit 2014 im AK Junprof. Dr. Esselen].

Zusammenfassend führen die Metabolite Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol durch die nachgewiesene Mikrokerninduktion, Beeinflussung der HDAC- und Topoisomerase-Aktivität zu DNA-Strangbrüchen. Zum DNA-strangbrechenden Potential von Methyleugenol und 1'-Hydroxymethyleugenol müssen weitere Wirkmechanismen verifiziert werden. Die DNA-Schäden führen zur Aktivierung der ATM/ATR-Signalkaskade und einer Arretierung der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus. Durch die Aktivierung von p53 kommt es nicht zu einer BRCA1-vermittelten Reparatur der DNA-Schäden, sondern es kommt zur p53-vermittelten-Apoptoseinduktion und zum Zelltod [Kastan und Lim, 2000; Shiloh, 2003; Fabbro *et al.*, 2004; Hirao *et al.*, 2002; Takai *et al.*, 2002; Levine, 1997]. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die zelluläre DNA-Schadensantwort in Verbindung mit dem programmierten Zelltod dazu beiträgt, dass die Testsubstanzen trotz gentoxischer Wirkung nicht mutagen *in vitro* wirken.



## **5.7 Zusammenfassende Diskussion zum Mechanismus der DNA-schädigenden Wirkung von Phenylpropanoiden**

Methyleugenol ist ein sekundärer Pflanzeninhaltsstoff, der strukturell zur Gruppe der Phenylpropanoide zählt. Methyleugenol kommt in verschiedenen Kräutern und Gewürzen, wie z.B. Basilikum, Fenchel, Estragon, Sternanis und Zimt vor. In Form von natürlichen ätherischen Ölen findet Methyleugenol sowohl als Aromastoff in verschiedenen Lebensmitteln (z.B. Eis, Bonbons) als auch als Duftstoff in unterschiedlichen Kosmetika (z.B. Seifen, Shampoo, Creme) Verwendung [Gardner *et al.*, 1997; NTP, 2000; Jeurissen *et al.*, 2006]. Methyleugenol wurde auf Grund von Ergebnissen aus Langzeit-Tierstudien als gentoxisches Kanzerogen eingestuft und sollte daher in der Verwendung eingeschränkt werden [SCF, 2001; BgVV, 2002]. Auch aktuelle Studien zeigen das gentoxische Potential von Methyleugenol auf. So wurde im Ames Test mit SULT-Aktivität eine mutagene Wirkung nach Inkubation mit Methyleugenol festgestellt [Herrmann *et al.*, 2012]. In Rattenhepatozyten wurde die Bildung von Desoxyadenosin- und Desoxyguanosin-Addukten nach Inkubation mit Methyleugenol gezeigt [Cartus *et al.*, 2012]. Ebenso wurden in der Leber von Mäusen Methyleugenol-DNA-Addukte detektiert [Herrmann *et al.*, 2014]. Weiter wurden in einer Studie von Herrmann *et al.* DNA-Addukte von Methyleugenol in humanen Leberbiopsieproben nachgewiesen [Herrmann *et al.*, 2013]. Auf Grund der verschiedenen Expositionsmöglichkeiten und des unterschiedlichen Konsumverhaltens der Verbraucher sowie der geringen Datenlage bezüglich der eventuellen Gesundheitsgefährdung ist es schwierig, eine abschließende Risikobewertung durchzuführen. Auf Grund der Aufklärung der möglichen Bioaktivierung von Methyleugenol können Bevölkerungsgruppen, die möglicherweise ein erhöhtes Risiko auf Grund von Lebensstilfaktoren oder genetischer Polymorphismen haben, identifiziert werden [Jeurissen *et al.*, 2006; Rietjens *et al.*, 2005]. Weitere Aspekte, die bei der Risikobewertung von Methyleugenol zu berücksichtigen sind, sind die Toxikokinetik der Umwandlung zu gentoxischen Metaboliten und die Kinetik zur Reparatur der entstandenen DNA-Addukte durch Methyleugenol. Auch Speziesunterschiede und mechanistische Daten spielen eine wichtige Rolle bei der Extrapolation von Hochdosis-Tierversuchsdaten zum Niedrigdosen-Bereich beim Menschen und erschweren damit eine abschließende

Risikobewertung [Al-Subeihi *et al.*, 2011; Al-Subeihi *et al.*, 2012; Rietjens *et al.*, 2005].

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Aufklärung möglicher Wirkmechanismen, die die beobachteten gentoxischen Eigenschaften von Methyleugenol und den ausgewählten oxidativen Phase-I-Metaboliten an HT29 Zellen begründen. In der Literatur wurde die Bioaktivierung von Methyleugenol durch CYP-450 Enzyme (CYP 450 1A2; 2C9, 2D6 und 2C19) zum reaktiven Metaboliten 1'-Hydroxymethyleugenol beschrieben [Jeurissen *et al.*, 2006]. Durch anschließende enzymatische Sulfonierung des Phase-I-Metaboliten durch Sulfotransferasen entsteht ein instabiles Intermediat, welches in wässriger Umgebung spontan zum elektrophilen Carbokation zerfällt. Dieses gilt als ultimates Kanzerogen, welches an Proteine und DNA binden kann [Gardner *et al.*, 1997]. Als Testsubstanzen wurden die oxidativen Metaboliten 1'-Hydroxymethyleugenol, Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol auf Grund ihres unterschiedlichen Wirkprofils herangezogen. 1'-Hydroxymethyleugenol wurde in das Testsystem integriert, da es ein Hauptmetabolit von Methyleugenol darstellt und seine Wirkungen bereits vielfach in der Literatur beschrieben wurden [Cartus *et al.*, 2012; Herrmann *et al.*, 2012; Jeurissen *et al.*, 2006; Gardner *et al.*, 1997]. Epoxiden wird prinzipiell eine hohe Affinität zur DNA zugesprochen, so dass das stabile Methyleugenol-2',3'-epoxid als potentieller DNA-Addukt-Bildner mit in die Untersuchungen einbezogen werden soll [NTP, 2000]. 3'-Oxomethylisoeugenol stellt durch seine Aldehydgruppe in der Seitenkette eine strukturell interessante Substanz dar.

Um einen Beitrag zytotoxischer Effekte der Testsubstanzen in den weiteren Untersuchungen an HT29 Zellen auszuschließen und diese Ergebnisse mit den Resultaten der Zytotoxizitätsuntersuchung an V79 Zellen zu vergleichen, wurde zunächst die Beeinflussung des Zellwachstums nach Inkubation mit Methyleugenol und den Metaboliten untersucht.

Methyleugenol zeigte im SRB Test weder nach 24-stündiger noch nach 48-stündiger und 72-stündiger Inkubation in Konzentrationen bis 100 µM wachstumshemmende Effekte auf HT29 Zellen. Auch im SRB Test an V79 Zellen konnte für Methyleugenol bis 100 µM und den gleichen Inkubationszeiten bis 72 Stunden keine wachstumshemmenden Eigenschaften nachgewiesen werden [Groh *et al.*, 2012]. Ebenso wurden im WST-1 Test keine zytotoxischen Effekte für Methyleugenol bis

100  $\mu\text{M}$  sowohl nach einstündiger als auch 24-stündiger Inkubation detektiert [Groh *et al.*, 2012]. In Untersuchungen an Rattenhepatozyten zeigten sich keine zytotoxischen Effekte bis 3000  $\mu\text{M}$  [Burkey *et al.*, 2000]. In einer Studie von Cartus *et al.* wurden im LDH-Test zytotoxische Effekte von Methyleugenol nach 24-stündiger Inkubation von primären Rattenhepatozyten in Konzentrationen  $\geq 2000 \mu\text{M}$  detektiert. Im Resazurintest wurde hier ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $307 \pm 52 \mu\text{M}$  berechnet [Cartus *et al.*, 2012]. Die primären Rattenhepatozyten sind im Vergleich zu V79 Zellen und HT29 Zellen metabolisch stark aktiv, da sie sowohl zum Phase I als auch zum Phase II Metabolismus befähigt sind [Guillouzo, 1998; Bonnery *et al.*, 1974; Lin *et al.*, 1975; Forster, 1986; Fogh, 1975; Glatt *et al.*, 1990; Pool-Zobel *et al.*, 2005]. Ähnlich der Muttersubstanz verhielt sich der Hauptmetabolit 1'-Hydroxymethyleugenol; selbst nach der Langzeitinkubation von 72 Stunden in Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$  erwies sich 1'-Hydroxymethyleugenol als nicht wachstumshemmend auf HT29 Zellen. Ebenso verhielt sich der Hauptmetabolit im SRB Test an V79 Zellen. Auch hier zeigte er bis 100  $\mu\text{M}$  nach 72 Stunden wie die Muttersubstanz keinen Zellwachstumseffekt [Groh *et al.*, 2012]. Auch im WST-1 Test konnte nach einstündiger und 24-stündiger Inkubation keine zytotoxischen Effekte von Methyleugenol und dem Hauptmetaboliten nachgewiesen werden [Groh *et al.*, 2012]. In metabolisch kompetenteren Zellen wie den primären Rattenhepatozyten wurde für 1'-Hydroxymethyleugenol ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $46 \pm 14 \mu\text{M}$  errechnet [Cartus *et al.*, 2012]. Anders verhält sich Methyleugenol-2'-3'-epoxid, nach 48-stündiger Inkubation wurde in der höchsten Konzentration (100  $\mu\text{M}$ ) ein signifikanter Rückgang des Zellwachstums beobachtet. Nach 72-stündiger Inkubation wurde dieser Effekt bereits ab einer Konzentration  $\geq 75 \mu\text{M}$  erfasst. Im SRB Test an V79 Zellen zeigte auch Methyleugenol-2',3'-epoxid nach 72-stündiger Inkubation zellwachstumshemmende Eigenschaften. Ebenso wurde im WST-1 Test an V79 Zellen ein signifikanter Rückgang der Zellviabilität sowohl nach einstündiger als auch 24-stündiger Inkubation in der höchsten Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$ ) nachgewiesen [Groh *et al.*, 2012]. Epoxiden wird eine hohe Reaktivität zugesprochen [NTP, 2000]. Auch eine Umwandlung zu Diolen über Epoxidhydrolasen könnten die wachstumshemmenden Eigenschaften begründen [Yang *et al.*, 1977; de Waziers *et al.*, 1990; Decker *et al.*, 2009]. So besitzen V79 Zellen und HT29 Zellen Epoxidhydrolase-Aktivität [Glatt *et al.*, 1990; Fogh, 1975]. Jedoch müssen die zytotoxischen Eigenschaften der Dirole in weiteren Untersuchungen verifiziert werden. Nach 48-stündiger Inkubation von

HT29 Zellen mit dem Metaboliten 3'-Oxomethylisoeugenol wurde in der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  ein signifikanter Rückgang des Zellwachstums festgestellt. Die maximale und signifikante Hemmung wurde nach 72-stündiger Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  3'-Oxomethylisoeugenol erreicht; hier betrug der Lebendproteinanteil nur mehr etwa 40% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (100%). Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen aus dem SRB Test und WST-1 Test an V79 Zellen überein, auch hier wurden für 3'-Oxomethylisoeugenol zellwachstumshemmende und zytotoxische Eigenschaften festgestellt [Groh *et al.*, 2012]. Auch an den metabolisch kompetenten Rattenhepatozyten wurden zytotoxische Effekte nach 24-stündiger Inkubation mit 3'-Oxomethylisoeugenol festgestellt. Hier wurde im Resazurintest ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $328 \pm 58 \mu\text{M}$  berechnet [Cartus *et al.*, 2012]. Zusammenfassend wurden nur nach 48- und 72-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen Hemmeffekte auf das Wachstum von HT29 Zellen detektiert, weshalb ein zu testender Konzentrationsbereich von 10  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  für die Versuchszeiten von maximal 24 Stunden festgelegt wurde.

In der anschließenden Untersuchung zur DNA-schädigenden Wirkung von Methyleugenol und den oxidativen Metaboliten an HT29 Zellen mittels Einzelzellgelelektrophorese wurde nur eine marginale gentoxische Wirkung von Methyleugenol in der höchsten getesteten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  nach 24-stündiger Inkubation festgestellt. Im Vergleich zur Testung an V79 Zellen zeigte sich bei der 24-stündigen Inkubation mit Methyleugenol bereits ab einer Konzentration  $\geq 50 \mu\text{M}$  eine signifikante DNA-schädigende Wirkung. Dies zeigt, dass V79 Zellen sensibler auf die Testsubstanz reagieren. Eine mögliche Erklärung könnte die verschiedene Reparaturkinetik der DNA der beiden Zelllinien darstellen [Azqueta und Collins, 2013]. Weiter könnte die unterschiedliche Verdopplungszeit der Zelllinien von Bedeutung sein. Die Verdopplungszeit von V79 Zellen beträgt etwa 12 Stunden, während sie bei HT29 Zellen zwischen 40-60 Stunden beträgt [DSMZ; Fogh, 1975]. Aus diesem Grund können V79 Zellen möglicherweise weniger Zeit für Reparaturmechanismen im Vergleich zu HT29 Zellen haben. Ebenso die Überexpression von Drug Efflux Transportern, insbesondere die ABC-Transporter, in Krebszelllinien können bei dem Vergleich dieser beiden Zelllinien eine wichtige Rolle spielen [Gottesman *et al.*, 2002; Jendzelovsky *et al.*, 2009]. So ist bekannt, dass Substanzen, die ABC Transporter aktivieren, auch Cytochrom P450 Enzyme induzieren [Lum und Gosland, 1995; Jendzelovsky *et al.*, 2009]. Ein Zusammenspiel

von dem Efflux-System und den metabolischen Enzymen bilden damit eine effektive Methode der Substanz-Eliminierung aus Zellen. V79 Zellen haben keine CYP450 Aktivität [Glatt *et al.*, 1990]. Die Anwesenheit von CYP450 Enzymen und die Überexpression von ABC-Transporter in HT29 Zellen sprechen für eine schnellere Eliminierung der Testsubstanzen aus den HT29 Zellen als aus V79 Zellen, so dass dies auch eine vermutete Begründung für die niedrigere DNA-Strangbruchrate der Testsubstanz in HT29 Zellen darstellen kann. Genauere Untersuchungen zur Unterstützung dieser Hypothese sind jedoch notwendig. Die Datenlage zur Gentoxizität von Methyleugenol wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Methyleugenol erwies sich in einigen *in vitro* Mutagenitätstests wie beispielsweise im Ames *Salmonella typhimurium* Test und im *Escherichia coli* Reversion Mutation Test ohne oder mit metabolischer Aktivierung als negativ [Brennan *et al.*, 1996; Dorang *et al.*, 1977; Mortelmann *et al.*, 1986; Schiestl *et al.*, 1989; Sekizawa und Shibamoto, 1982]. Hingegen konnte in einer Studie von Hermann *et al.*, gezeigt werden, dass Methyleugenol mutagen im Ames *Salmonella typhimurium* Test des Stammes TA100 ist, welcher verschiedene SULTs exprimiert [Herrmann *et al.*, 2012]. Ein gentoxisches Potential von Methyleugenol wurde auch im UDS-Test an Rattenhepatozyten im Konzentrationsbereich zwischen 10 und 500  $\mu\text{M}$  nachgewiesen [Burkey *et al.*, 2000]. Durch Inkubation von CHO-Zellen (Hamster-Ovarien mit metabolischer Aktivierung) mit Methyleugenol wurden Schwesterchromatid-Austausche induziert [BgVV, 2002; NTP, 2000; Robison *et al.*, 2006]. Untersuchungen von Frau Rudakovski zur Mikrokerninduktion zeigten keine Erhöhung der Mikrokernrate durch Methyleugenol (Konzentration  $\leq 100 \mu\text{M}$ ) nach 24-stündiger Inkubation in HT29 Zellen [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Junprof. Dr. Esselen]. Auch an V79 Zellen zeigte sich keine Mikrokerninduktion durch Methyleugenol ( $\leq 100 \mu\text{M}$ ) [Groh *et al.*, 2012].

1'-Hydroxymethyleugenol zeigte im Vergleich zur Muttersubstanz ein deutlich gentoxisches Potential. Bereits ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  traten nach 24-stündiger Inkubation erste signifikante DNA-Strangbrüche auf. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Ergebnissen an V79 Zellen. Auch hier zeigte sich ein deutlich gentoxisches Potential von dem 1'-Hydroxy-Metabolit mit einem DNA-strangbrechenden Potential in Konzentrationen  $\geq 25 \mu\text{M}$  [Groh *et al.*, 2012].

Im Mikrokerninduktionstest zeigte der Hauptmetabolit im Gegensatz zur Muttersubstanz eine signifikante Erhöhung der Mikrokernrate an HT29 Zellen in allen

getesteten Konzentrationen, jedoch war keine konzentrationsabhängige Wirkung festzustellen [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Esselen]. Hingegen traten an V79 Zellen ähnlich der Muttersubstanz keine Bildung von Mikrokernen nach Inkubation mit 1'-Hydroxymethyleugenol auf [Groh *et al.*, 2012].

Methyleugenol-2',3'-epoxid zeigte ein deutlich stärkeres DNA-schädigendes Potential als die Muttersubstanz. Der Metabolit induzierte in HT29 Zellen DNA-Strangbrüche in Konzentrationen  $\geq 25 \mu\text{M}$ . Diese Ergebnisse werden auch durch die Studie an V79 Zellen bestätigt. Auch hier besitzt Methyleugenol-2',3'-epoxid ein deutlich gentoxisches Potential [Groh *et al.*, 2012]. Auch in der Untersuchung zur Mikrokerninduktion an HT29 Zellen wurde eine potente Wirkung in einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  beobachtet [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Junprof. Dr. Esselen]. Ebenso wurde in der Studie von Frau Kajzar eine signifikante Zunahme an Mikrokernen nach einstündiger Inkubation in der höchsten Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  an V79 Zellen nachgewiesen [Groh *et al.*, 2012]. Sowohl die Mikrokerninduktion als auch die DNA-strangbrechende Wirkung von Methyleugenol-2',3'-epoxid tragen möglicherweise zur gezeigten Wachstumshemmung bei; so wurde nach 72-stündiger Inkubation an V79 Zellen ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $82 \pm 25 \mu\text{M}$  ermittelt und auch in HT29 Zellen wurde nach 72-stündiger Inkubation eine signifikant wachstumshemmend Wirkung in einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  detektiert [Groh *et al.*, 2012].

Im Gegensatz dazu wurde nach einstündiger Inkubation von HT29 Zellen mit 3'-Oxomethylisoeugenol keine DNA-schädigende Wirkung beobachtet; jedoch kam es nach einer verlängerten Inkubationsdauer von 24 Stunden zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der DNA-Strangbruchrate. Die im Gegensatz zu den anderen Testsubstanzen verzögerte DNA-strangbrechende Wirkung von 3'-Oxomethylisoeugenol könnte durch folgende Theorien möglicherweise begründet werden: Zum einen könnte 3'-Oxomethylisoeugenol weiter metabolisiert werden zu einem DNA-strangbrechenden "Sekundärmetabolit". Eine andere These könnte die zeitverzögerte Aufnahme von 3'-Oxomethylisoeugenol in die Zelle darstellen, zum Beispiel auf Grund des Proteinbindungsvermögen des Aldehyden. In einer Stabilitätsuntersuchung von 3'-Oxomethylisoeugenol gab es erste Hinweise, dass nach 24 Stunden 3'-Oxomethylisoeugenol möglicherweise durch Alkoholdehydrogenasen zu 3'-Hydroxymethylisoeugenol metabolisiert wird.

Diese Hinweise werden durch Stabilitätsuntersuchungen von 3'-Oxomethylisoeugenol nach Inkubation von V79 Zellen gestützt [Vallicotti, Forschungsarbeit 2012 in der AG Junprof. Dr. Esselen; unveröffentlichte Daten]. Basierend auf diesen Daten könnten die Ergebnisse der Gentoxizitätsuntersuchungen durch folgende Hypothese begründet werden. Auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit des 3'-Hydroxymethylisoeugenol zu 1'-Hydroxymethyleugenol konnte von einer vergleichbaren DNA-strangbrechenden Potenz ausgegangen werden, was auch in einer Untersuchung von 3'-Hydroxymethylisoeugenol in der Einzelzellgelelektrophorese bestätigt werden konnte. Nach einstündiger Inkubation an V79 Zellen wurde für 3'-Oxomethylisoeugenol bis 100  $\mu\text{M}$  keine signifikante Erhöhung an Mikrokernen festgestellt, wohingegen nach 24-stündiger Inkubation es zu einer signifikanten Zunahme von Mikrokernen in Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$  kam [Groh *et al.*, 2012]. Auch die Untersuchung der Mikrokernrate an HT29 Zellen zeigte nach 24-stündiger Inkubation eine konzentrationsabhängige Mikrokerninduktion in Konzentrationen  $\geq 10 \mu\text{M}$  [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Junprof. Dr. Esselen]. Zur Aufklärung des Wirkmechanismus der Mikrokernbildung durch die oxidativen Metabolite Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol wurde die CREST-Färbung durchgeführt. Hierbei zeigte sich der aneugene Ursprung chromosomaler Schäden in V79 Zellen. Daraus lässt sich ableiten, dass diese Metaboliten mit den Mikrotubulis des Spindelapparates reagieren können und somit eine Störung der Chromosomenverteilung hervorrufen [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Junprof. Dr. Esselen]. Sowohl die DNA-Strangbrüche als auch die Mikrokerne könnten zu den gezeigten wachstumshemmenden Effekten von 3'-Oxomethylisoeugenol beitragen (72-stündiger Inkubation,  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $76 \pm 11 \mu\text{M}$  an V79 Zellen und  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $100 \pm 25 \mu\text{M}$  an HT29 Zellen ermittelt) [Groh *et al.*, 2012]. In einer Studie von Cartus *et al.*, wurden Desoxyadenosin- und Desoxyguanosin-Addukte nach Inkubation mit 3'-Oxomethylisoeugenol an Rattenhepatozyten nachgewiesen, was das gentoxische Potential dieses Metaboliten bestätigt [Cartus *et al.*, 2012].

Um die potentiellen zellulären Zielstrukturen von Methyleugenol und seiner oxidativer Metaboliten zu charakterisieren, wurde eine mögliche Beeinflussung der Zellzyklusverteilung von HT29 Zellen bestimmt. Methyleugenol zeigte keinen Effekt

auf die Zellzyklusverteilung der Nocodazol-synchronisierten HT29 Zellen. Hingegen führte 1'-Hydroxymethyleugenol in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zu einem marginal arretierenden Effekt in der  $G_2/M$ -Phase. Die Inkubationen mit Methyleugenol-2',3'-epoxid (100  $\mu\text{M}$ ) und 3'-Oxomethylisoeugenol ( $\geq 50 \mu\text{M}$ ) führten zu einem signifikanten Festhalten der Zellen im Nocodazol-induziertem  $G_2/M$ -Arrest [Rudakovski, Diplomarbeit 2013 in der AG Junprof. Dr. Esselen]. Die gezeigten Effekte auf den Zellzyklusverlauf stehen möglicherweise im Zusammenhang mit der Interaktion der Methyleugenolmetaboliten mit Zellteilungs-assoziierten Enzymen, wie z.B. Histondeacetylasen und Topoisomerasen, welche in der vorliegenden Arbeit mit in die Untersuchungen einbezogen wurden [Liu *et al.*, 2013; Montariello *et al.*, 2013; Saldanha *et al.*, 2014]. Die Metaboliten Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol hemmten signifikant die HDAC-Aktivität in HT29 Zellen in Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$  [Groh *et al.*, 2013]. Jedoch konnte kein Einfluss auf die HDAC Expression der Isoformen 1 - 6 (Abb. 59 bis Abb. 64) festgestellt werden. Dies deutet daraufhin, dass es sich um eine rein enzymatische Hemmwirkung handelt, was in weiterführenden Untersuchungen mit rekombinantem HDAC-Enzym verifiziert werden müsste. So könnte eine Beeinflussung der Expression der anderen HDAC-Isoformen durch die Testsubstanzen erfolgen. Es sind bereits zahlreiche HDAC-Hemmstoffe bekannt, die die Aktivität des Enzyms beeinflussen, jedoch nicht die Expression, wie zum Beispiel Trichostatin A und Natriumbutyrat [Bi und Jiang, 2006]. Es wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass Methyleugenolmetaboliten die zelluläre HDAC-Aktivität beeinflussen.

Eine Beeinflussung der Topoisomerase-Aktivität wurde zunächst in zellfreien Testsystemen untersucht. Hierbei zeigte weder die Muttersubstanz noch einer der Metaboliten einen inhibierenden Effekt auf die Topoisomerase II (Abb. 68). Anders stellte sich jedoch die Wirkung auf Topoisomerase I dar. Hier zeigte Methyleugenol-2',3'-epoxid in der höchsten getesteten Konzentration einen Hemmeffekt auf die Topoisomerase-I-Aktivität. 3'-Oxomethylisoeugenol hemmte hoch potent die Aktivität rekombinanter Topoisomerase I in Konzentrationen  $\geq 0,1 \mu\text{M}$  (Abb. 67). In der Literatur wurde Eugenol, welches auch zur Gruppe der Alkenylbenzene zählt, als Topoisomerasehemmstoff beschrieben [Maralhas *et al.*, 2006]. In einer weiteren Studie wurden protektive Effekte von Eugenol gegenüber dem Topoisomerasegift Doxorubicin im Hinblick auf dessen Kardiotoxizität an Ratten beschrieben [Fouad und Yacoubi, 2011]. Keine der Testsubstanzen führte zu einer



verstärkten Bindung von Topoisomerase an die DNA nach einstündiger Inkubation von HT29 Zellen; sie wirken nicht als so genannte Topoisomerasegifte (Abb. 69; Abb. 70 und Abb. 71). Somit kann postuliert werden, dass es sich bei 3'-Oxomethylisoeugenol um einen katalytischen Topoisomerase-I-Hemmstoff handelt, der möglicherweise die Wirkung klassischer Topoisomerase-I-Gifte, wie Camptothecin limitiert. Eine Untersuchung in der Einzelzellgelelektrophorese mit Prä- und Coinkubation von HT29 Zellen mit 3'-Oxomethylisoeugenol und 100  $\mu\text{M}$  Camptothecin zeigte, dass 3'-Oxomethylisoeugenol in Konzentrationen  $\geq 10 \mu\text{M}$  das DNA-strangbrechende Potential des Topoisomerasegiftes Camptothecin nach einstündiger Inkubation signifikant reduziert (Abb. 73). Nach 23-stündiger Inkubation mit 3'-Oxomethylisoeugenol und anschließender Coinkubation für eine Stunde mit Camptothecin war der Effekt nur in der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zu beobachten, da hier möglicherweise die DNA-strangbrechende Wirkung des Metaboliten selbst zum Tragen kommt. Zur weiteren Charakterisierung des Wirkmechanismus von 3'-Oxomethylisoeugenol wurde der ICE-Bioassay nach Prä- und Coinkubation mit Camptothecin (100  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. 3'-Oxomethylisoeugenol hemmte signifikant die Topoisomerase-I-DNA-Komplexstabilisierung durch Camptothecin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ , was die Hypothese unterstützt, dass es sich bei 3'-Oxomethylisoeugenol um einen katalytischen Topoisomerase I Hemmstoff handelt (Abb. 74).

Auf Grund der DNA-strangbrechenden Wirkung sowie DNA-Schaden-assoziiierter Zielenzyme wurde der Einfluss von Methyleugenol und den ausgewählten oxidativen Metaboliten auf die Expression von phosphoryliertem H2AX ( $\gamma\text{H2AX}$ ) als ein Biomarker für DNA-Doppelstrangbrüche untersucht [Redon *et al.*, 2002; Bonner *et al.*, 2008; Dickey *et al.*, 2009; Watters *et al.*, 2009; Mah *et al.*, 2010]. Es zeigte sich für Methyleugenol ein marginaler Anstieg der  $\gamma\text{H2AX}$  Expression ohne jedoch ein statistisches Signifikanzniveau zu erreichen (Abb. 75). 1'-Hydroxymethyleugenol erhöhte die Expression von  $\gamma\text{H2AX}$  in Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$  und auch die Metaboliten Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol induzierten signifikant den Proteinstatus für  $\gamma\text{H2AX}$  in Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  (Abb. 75). Auf Grund der erhöhten Expression von  $\gamma\text{H2AX}$  wurde auch der Einfluss der Testsubstanzen auf den Phosphorylierungsstatus der Kinasen ATM und ATR untersucht. Durch eine vorliegende DNA-Schädigung (vor allem durch DNA-Doppelstrangbrüche) werden ATM und ATR aktiviert. Die Phosphorylierung von ATM

und ATR wird daher als weiterer Biomarker für eine DNA-schädigende Wirkung verwendet [Kastan und Lim, 2000; Motoyama und Naka, 2004]. Dabei zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation der Testsubstanzen keine Steigerung der Phosphorylierung von ATM und ATR (Abb. 77 und Abb. 78). Nur nach zweistündiger Inkubation konnte eine Wirkung auf den Expressionsstatus von ATM und ATR gezeigt werden (Abb. 79 und Abb. 80). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Einzelzellgelelektrophorese. So wurden bereits nach einstündiger Inkubation mit den Testsubstanzen an V79 Zellen DNA-Schäden detektiert [Groh *et al.*, 2012]. Die ATM/ATR-Phosphorylierung ist eine schnelle Signalantwort auf DNA-Strangbrüche [Palii *et al.*, 2013]. Nach 24 Stunden ist möglicherweise das zelluläre Signal wieder aufgehoben und ATM/ATR-nachfolgende Zielenzyme, wie zum Beispiel CHK1, CHK2 und p53, aktiviert [Kastan und Lim, 2000; Motoyama und Naka, 2004; Shiloh, 2003]. Im Einklang zu den Daten der H2AX-Phosphorylierung führte Methyleugenol nur zu einem marginalen Anstieg der Expressionsrate von phospho-ATM und phospho-ATR. Auch führte die 24-stündige Inkubation mit Methyleugenol zu einem marginalen Anstieg des Phosphorylierungsstatus von CHK1 und p53. Die Metaboliten führten nach zweistündiger Inkubation zu signifikanten Effekten auf die Expression von phospho-ATM und phospho-ATR; so steigerten 1'-Hydroxymethyleugenol und 3'-Oxomethylisoeugenol den Phosphorylierungsstatus von ATM und ATR in Konzentrationen von 100 µM. Nach Inkubation mit Methyleugenol-2',3'-epoxid wurde ab einer Konzentration von 50 µM eine erhöhte Expression von phospho-ATM und ab 100 µM eine signifikante Erhöhung des Proteinstatus von phospho-ATR detektiert. Das Resultat des Einflusses auf den Phosphorylierungsstatus von ATM und ATR nach Kurzzeitinkubation bestätigt die in der Einzelzellgelelektrophorese beobachtete DNA-schädigende Wirkung von Methyleugenol und den Metaboliten. So induzierten die Substanzen sowohl nach einstündiger Inkubation als auch nach 24-stündiger Inkubation DNA-Strangbrüche [Groh *et al.*, 2012]. Mit Ausnahme des Metaboliten 3'-Oxomethylisoeugenol, da nach einstündiger Inkubation mit 3'-Oxomethylisoeugenol keine DNA-schädigende Wirkung detektiert wurde. Eine mögliche DNA-Schädigung nach zweistündiger Inkubation mit diesem Metaboliten müsste noch untersucht werden. Weiter gab eine Stabilitätsuntersuchung Hinweise darauf, dass 3'-Oxomethylisoeugenol zu 3'-Hydroxymethylisoeugenol metabolisiert wird. Dieser Metabolit zeigte DNA-strangbrechendes Potential nach einstündiger Inkubation von HT29 Zellen.

Nach 24-stündiger Inkubation der HT29 Zellen mit den Metaboliten wurden der Phosphorylierungsstatus von CHK1 signifikant beeinflusst; so steigerte 1'-Hydroxymethyleugenol und 3'-Oxomethylisoeugenol die Expression ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  und Methyleugenol-2',3'-epoxid bereits ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  (Abb. 81). Weiter zeigte sich ein Effekt auf die Expression des CHK-nachgeschalteten Tumorsuppressorproteins p53 nach 24-stündiger Inkubation mit den Metaboliten (Abb. 83). 1'-Hydroxymethyleugenol und Methyleugenol-2',3'-epoxid steigerten in Konzentrationen  $\geq 50 \mu\text{M}$  signifikant den Phosphorylierungsstatus von p53. Auch 3'-Oxomethylisoeugenol steigerte die Expression von phospho-p53 in der höchsten getesteten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Die Steigerung des Phosphorylierungsstatus von p53 steht mit dem beobachteten G<sub>2</sub>/M-Arrest nach Inkubation mit den Testsubstanzen in Verbindung. Auch ist in der Literatur die Aktivierung von p53 über CHK1 beschrieben [Gottifredi *et al.*, 2001; Yi-Hung *et al.*, 2005; Bo *et al.*, 2014].

Eine Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von CHK2 und des DNA-Reparaturenzyms BRCA1 nach 24-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen konnte hingegen in Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$  nicht nachgewiesen werden (Abb. 82 und Abb. 84). Jedoch wurde die Induktion der Apoptose über p53 und Caspase 3 durch die Metaboliten beobachtet [Ates, Diplomarbeit 2014 im AK Junprof. Dr. Esselen].

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die oxidativen Metaboliten von Methyleugenol einen erheblichen Anteil zur Toxizität der Muttersubstanz durch ihre ausgeprägte Reaktivität gegenüber verschiedenen zellulären Zielstrukturen beitragen. Dabei kommen unterschiedliche Wirkmechanismen der Gentoxizität zum Tragen, wie die Beeinflussung von HDAC und Topoisomerase I sowie Effekte auf die Signaltransduktionskaskade von ATM und ATR und die Störung des mitotischen Spindelapparates und des Zellzyklusverlaufs. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die zelluläre DNA-Schadensantwort in Verbindung mit der Apoptoseinduktion einen Beitrag zur fehlenden *in vitro* Mutagenität der Testsubstanzen leistet.

Auf Grund der hier erzielten Ergebnisse scheint es notwendig, für eine vollständige Risikoevaluierung die verschiedenen Wirkmechanismen der unterschiedlichsten Metaboliten und nicht nur des 1'-Hydroxy-Metaboliten mit in die Bewertung einzubeziehen.

## **6. Zusammenfassung**

Methyleugenol ist ein sekundärer Pflanzeninhaltsstoff, der in verschiedenen Kräutern und Gewürzen vorkommt. In Form von natürlichen ätherischen Ölen findet Methyleugenol als Aromastoff in Lebensmitteln und als Duftstoff in Kosmetika Verwendung [Gardner *et al.*, 1997; NTP, 2000]. Methyleugenol wurde auf Grund von Ergebnissen aus Tierstudien als gentoxisches Kanzerogen eingestuft [SCF, 2001]. Ein Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf wirkmechanistischen Untersuchungen zur Gentoxizität von Methyleugenol und ausgewählten oxidativen Phase-I-Metaboliten. So wurden direkt gentoxische Wirkmechanismen, wie die Induktion von DNA-Strangbrüchen oder Mikrokernen in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 detektiert. Hierbei zeigte sich der aneugene Ursprung chromosomaler Schäden. Mögliche Interaktionen mit Proteinen des Spindelapparates müssen in weiterführenden Studien verifiziert werden. Auf Grund der fehlenden *in vitro* Mutagenität der Verbindungen im V79-HPRT-Genmutationstest [Groh *et al.*, 2012] sollten weitere Wirkmechanismen zum DNA-strangbrechenden Potential sowie potentielle Effekte auf DNA-Reparaturprozesse durch die Testsubstanzen charakterisiert werden.

Die Metaboliten Methyleugenol-2',3'-epoxid und 3'-Oxomethylisoeugenol hemmen im mikromolaren Konzentrationen die HDAC- und Topoisomerase-I-Aktivität und tragen somit möglicherweise zum DNA-strangbrechenden Potential bei. 3'-Oxomethylisoeugenol wurde dabei als katalytischer Hemmstoff humaner Topoisomerase I identifiziert, welcher signifikant die DNA-strangbrechende Wirkung und die Enzym/DNA-stabilisierenden Effekte des Topoisomerase-I-Giftes Camptothecin hemmt. In Folge der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Testsubstanzen kommt es nach Kurzzeitinkubation (2 Stunden) zur Aktivierung der ATM/ATR-Signalkaskade und einer Arretierung der Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus nach 36 Stunden. Im weiteren Verlauf wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 durch die Testsubstanzen ein Anschalten apoptotischer Prozesse, wie Caspase-3-Aktiveringung und PARP-Spaltung, bedingt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die zelluläre DNA-Schadensantwort in Verbindung mit dem programmierten Zelltod dazu beitragen, dass die initialen gentoxischen Wirkungen der Substanzen zu keiner direkten Mutagenität *in vitro* führen. Insgesamt konnte die Arbeit zeigen, dass reaktive oxidative Metaboliten von

Methyleugenol eine Vielzahl zellulärer Strukturen beeinflussen und eine potentielle *in vitro* Genotoxizität aufweisen, weshalb sie in ihrer Gesamtheit in der Risikobewertung der Ausgangssubstanz berücksichtigt werden sollten.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der posttranslationalen Histondeacetylase-Modifikation durch Polyphenole. Dabei wurden drei Vertreter Chlorogensäure (Kaffee), (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG, Grüntee), Genistein (Soja), die in größeren Mengen mit unserer Nahrung aufgenommen werden, mit in die Untersuchungen einbezogen. Die drei untersuchten Polyphenole beeinflussten die SUMO E1 Expression. Weiter wurde gezeigt, dass EGCG und Genistein Einfluss auf die HDAC-Aktivität und auf den HDAC 1 Proteinstatus in der intakten Kolonkarzinomzelllinie nehmen. HDAC gehört zu den SUMO-Substratproteinen, so dass eine Interaktion zwischen SUMO E1 und HDAC 1 nach Inkubation mit den Polyphenolen nachgewiesen werden konnte. EGCG und Genistein beeinflussen möglicherweise epigenetische Signalwege in Tumorzellen, welche die Hypothese chemopräventiver Eigenschaften der Polyphenole unterstützen. Jedoch ist auch bekannt, dass EGCG und Genistein DNA-Strangbrüche induzieren [Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2013; Yuquan *et al.*, 2001]. Inwieweit eine Beeinflussung der DNA-Integrität durch HDAC-Hemmstoffe ein Risiko für nicht-tumor Zellen darstellt und somit die Anwendung solcher Polyphenole z.B. als Nahrungsergänzungsmittel limitiert, muss in weiterführenden Studien noch geklärt werden.

## **7. Material und Methoden**

### **7.1 Zellkultur**

#### **7.1.1 Zelllinie**

Bei der HT29 Zelllinie handelt es sich um humane Kolonkarzinomzellen. Sie wurden erstmals 1964 aus einem Adenokarzinom des Kolons einer 44-jährigen Frau kaukasischer Abstammung isoliert. Dieser Tumor wird als heterotransplantabel beschrieben und bildet gut differenzierte Tumore ersten Grades aus [DSMZ, 2013]. Die Zellen wachsen adhärent als Monolayer oder in Kolonien. Die Verdopplungszeit beträgt 40 - 60 Stunden [Fogh, 1975].

HT29 Zellen werden in „*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*“ (DMEM mit 4,5 g/L Glukose, ohne Natriumpyruvat, Invitrogen) mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin/Streptomycin (PS, 10000 Einheiten/ 10000 µg/mL) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte kultiviert.

#### **7.1.2 Auftauen von Zellen**

Die bei -80°C im Kryoröhrchen gelagerten Zellen werden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension enthält 10% DMSO als Frostschutzmittel, so dass sie sofort mit 10 mL vorgewärmtem Kulturmedium verdünnt werden muss. Anschließend wird die Zellsuspension für fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 10 mL Kulturmedium, welches 20% FKS enthält, aufgenommen. Die Zellen werden mehrfach resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit werden die Zellen kultiviert [Lindl, 2008].

### 7.1.3 Mediumwechsel

Der regelmäßige Wechsel des Mediums ist notwendig, da bestimmte Bestandteile des Mediums von den Zellen metabolisiert werden oder bei 37°C im Laufe der Zeit zerfallen. Dieser Prozess wird durch einen Farbumschlag des pH-Indikators (Phenolrot) im Medium von rot nach gelb sichtbar, dies rührt von der Metabolisierung von Glukose nach Laktat her.

Nur durch den regelmäßigen Wechsel können das Wachstum und die Vitalität der Zellen erhalten bleiben [Lindl, 2008].

### 7.1.4 Subkultivieren (Passagieren) der Zellen

Wenn die gesamte Oberfläche der Kulturflasche mit Zellen bedeckt ist, wird von Konfluenz gesprochen. Da sich die Zellen beim Erreichen der Konfluenz in engem Kontakt befinden und keinerlei freie Oberfläche als Substrat vorhanden ist, hören die meisten Zellen auf sich zu teilen (Kontaktinhibition). Dies kann sogar zum Absterben der Zellkultur führen.

Aus diesem Grund ist es notwendig, die Zellen nach erreichter Maximaldichte zu subkultivieren, dies wird auch als „passagieren“ bezeichnet.

Am häufigsten wird eine Trypsin-Lösung zum Passagieren der Zellen verwendet. Dabei ist darauf zu achten, dass die Zellen nicht zu lange mit der Protease Trypsin behandelt werden, da dies die Zellen irreversibel schädigen kann.

Bevor man mit der Trypsin-Behandlung beginnt, sollten die Zellen mit PBS (einer phosphatgepufferten Salzlösung) gespült werden, da kleinste Reste des Mediums das Enzym in seiner Wirkung hemmen. Insbesondere das im Medium enthaltene FKS ist für die Inaktivierung des Trypsins verantwortlich.

Das Trypsin entfaltet seine optimale Wirkung bei 37°C. Die optimale Einwirkzeit ist erreicht, wenn sich die Mehrzahl der Zellen von dem Flaschenboden abgelöst hat. Dann wird der Trypsinierungsprozess durch Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt und die Zellen werden mehrmals resuspendiert, damit sie sich vereinzeln und unter Verdünnung weiter kultiviert bzw. für die Versuche eingesetzt werden können [Lindl, 2008].

### **Lösungen und Reagenzien zum Subkultivieren von Zellen:**

#### Nährmedium

500 mL DMEM "*high glucose*" (4,5 g/L) mit L-Glutamin  
10% FKS  
1% PenStrep  
Lagerung bei 4°C

#### PBS-Stammlösung

4,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
180 g NaCl  
8,18 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf 1L auffüllen  
pH = 7,4 einstellen  
Lagerung bei 4°C

#### PBS-Gebrauchslösung

25 mL Stammlösung mit 475 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  verdünnen  
bei 121°C für 20 Minuten autoklavieren

#### Trypsinlösung



### 7.1.5 Einfrieren und Lagern von Zellen

Die passagierten Zellen werden in serumhaltigen Medium mehrfach resuspendiert. Der Zellsuspension werden 10% DMSO zugesetzt, damit eine Kristallbildung und damit das Platzen der Zellen verhindert werden kann. In dieser Konzentration wirkt DMSO jedoch zelltoxisch, so dass die Zellsuspension direkt in 1 mL Aliquots abgefüllt auf -20°C heruntergekühlt wird. Nach ca. 12 Stunden können die Zellen bei -80°C gelagert werden [Lindl, 2008]. Schonender können Zellen auch in FKS eingefroren werden. So wird zunächst ein DMSO-FKS-Gemisch aus 1,2 mL DMSO und 2,8 mL FKS hergestellt. Danach werden 500 µL dieses Gemisches in jedes Kryoröhrchen vorgelegt. Die passagierten Zellen werden in serumhaltigem Medium (20% FKS) aufgenommen und mehrfach resuspendiert. Anschließend wird 1 mL der Zellsuspension zu dem DMSO-FKS-Gemisch zugegeben und auf -20°C heruntergekühlt. Auch hier werden die Zellen nach etwa 12 Stunden bei -80°C gelagert.

### 7.1.6 Mykoplasmentest

Mykoplasmen sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten [Razin *et al.*, 1998]. Sie sind in ihrer Form variabel und ihre Größe schwankt zwischen 0,2 und 2 µm. Diese Art der Bakterien ist gegen Penicillin und seine Derivate resistent. Anstatt einer Zellwand weisen sie nur eine dreischichtige Zytoplasmamembran auf [Falbe und Regitz, 1999].

Mykoplasmen wachsen auf der Oberfläche von Zellen ohne diese zu überwuchern (Abb.85 A, B). In der Zellkultur sind ca. 20 verschiedene Spezies beschrieben worden, wovon sechs besonders häufig sind: *Mykoplasma (M.) orale*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis* und *Acholeplasma laidlawii*. Die Folge einer Mykoplasmenkontamination können Veränderungen im Stoffwechsel der infizierten Zellkultur sein. Dies kann zu unangenehmen Artefakten bis hin zu Fehlinterpretationen von Versuchsergebnissen führen.

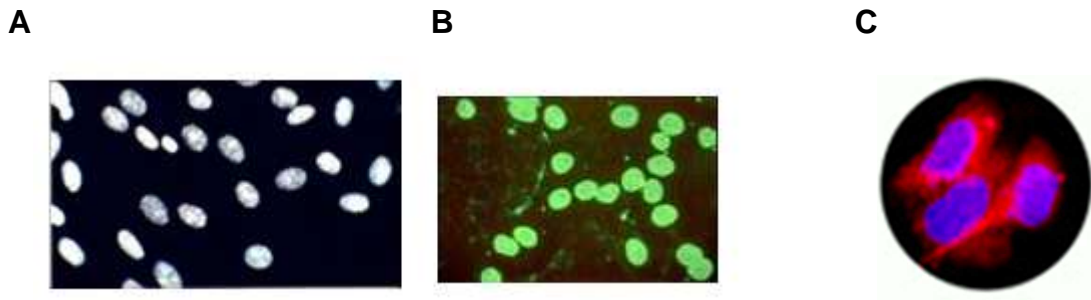


Abb.85: A: Zellen ohne Mykoplasmenbefall; B: Zellen mit Mykoplasmenbefall; DNA-Färbung mit DAPI oder Hoechst 33258; C: Färbung von Zellen mit DAPI und Sulforhodamin (blau: DNA-DAPI-Komplex; rot: Plasmaprotein)

[WWW.MEDUNIWIE.AC.AT; BIOMEDIZINISCHE METHODEN]

Kontaminationen mit Mykoplasmen können am schnellsten durch die Anfärbung der Mykoplasmen-DNA mit dem speziell an DNA bindenden Fluorochrom DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid) festgestellt werden. Für den Nachweis wird ein Superfrost-Objektträger in eine Petrischale gelegt und mit mehreren Tropfen Zellsuspension beschichtet. Die Petrischale wird mit 10 mL Medium aufgefüllt. Am darauf folgenden Tag wird der mit Zellen bewachsene Objektträger aus der Petrischale entnommen und mit -20°C kaltem Methanol übergossen. Zur Fixierung der Zellen wird der Objektträger über Nacht bei -20°C in Methanol gelagert. Anschließend wird mit einer DAPI/Sulforhodamin 101 Lösung angefärbt. Nach dem Auflegen eines Deckglases und dem Auftragen eines Öltropfens werden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die DNA-DAPI-Komplexe erscheinen blau-weiß (Abb.85C), während das Plasmaprotein durch das Sulforhodamin rot eingefärbt ist. Eine Kontamination mit Mykoplasmen liegt vor, wenn – meist um den Zellkern herum – blau-weiße Punkte im rotgefärbten Plasma zu erkennen sind [Lindl, 2008].

### **Lösungen und Reagenzien für Mykoplasmen Test:**

#### DAPI/SRB 101 Lösung

200 mM Tris

200 mM NaCl

8 µM DAPI

50 µM SRB 101

in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen und pH 7,6 einstellen

### 7.1.7 Elimination von Mykoplasmen

Die Behandlung mit Antibiotika hat sich als gute Methode zur Kurierung von mykoplasmeninfizierten Zellen bewährt [Hay *et al.*, 1989; Uphoff und Drexler, 2002; Gstraunthaler und Lindl, 2013]. Die Verwendung von Tiamutin und Minocyclin ist gut etabliert, da Mykoplasmen innerhalb kurzer Zeit (16-23 Tage) abgetötet werden, ohne Resistenzen hervorzurufen oder toxisch auf die Zellen zu wirken [Schmidt und Erfle, 1984]. Die beiden Antibiotika werden wie folgt eingesetzt: Tiamutin mit 10 µg/mL für drei Tage, danach Minocyclin mit 5 µg/mL für weitere vier Tage; dieses Schema kann ein- bis zweimal wiederholt werden. Eine weitere Methode zur Behandlung von mykoplasmeninfizierten Zellen ist die Anwendung von MRA (Mycoplasma Removal Agent, 4-Oxo-Chinolin-3-Carboxylsäure). MRA hemmt spezifisch die DNA-Gyrase der Mykoplasmen. Das Präparat wird für eine Woche bei einer Konzentration von 0,5-1 µg/mL eingesetzt.

Weitere Antibiotika, die gegen Mykoplasmen Verwendung finden, sind: Gentamycin, Kanamycin, Linomycin und Tylosin [Gstraunthaler und Lindl, 2013].

### 7.1.8 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl zu bestimmen, wird die Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer) verwendet (Abb.86). Dazu wird eine kleine Menge der Zellsuspension (ca. 25  $\mu\text{L}$ ) verwendet, die nach der Bestimmung der Zellzahl verworfen wird.

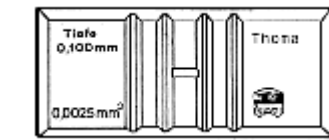


Abb.86: Neubauer-Zählkammer  
[WWW.NOVOGLAS.DE]

Zunächst müssen die Zellen mit Hilfe eines Farbstoffes, Trypanblau, angefärbt werden. Dabei handelt es sich um einen sauren Diazofarbstoff (als Grundkörper beinhaltet er das *o*-Tolidin), der als Polyanion an das Protein binden kann (Abb.87). Mit diesem Farbstoff kann auch die Viabilität der Zellen bestimmt werden, so werden tote Zellen blau gefärbt, wohingegen die vitalen Zellen unter dem Mikroskop weiß erscheinen, da diese den Farbstoff aktiv aus der Zelle transportieren können.

Die Farbaufnahme der Zellen ist pH-Wert abhängig, wobei die maximale Aufnahme bei pH 7,5 liegt. Da Trypanblau zytotoxisch ist, muss das Auszählen der Zellen unmittelbar nach der Zugabe des Farbstoffes erfolgen.

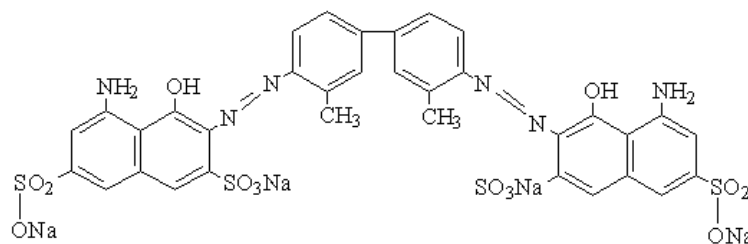


Abb.87: Strukturformel von Trypanblau  
[WWW.HU-BERLIN.DE]

Die Zellkammer wird dann mit Trypanblau versetzter Zellsuspension befüllt. Die Kammer darf dabei nicht unter- oder überfüllt werden, da Oberflächenspannungen das Volumen der Zählkammer verändern können.

Die Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten. Jedes große Quadrat hat eine Fläche von  $1 \text{ mm}^2$  und eine Tiefe von  $0,1 \text{ mm}$ ; dies ergibt ein Volumen von  $0,1 \text{ }\mu\text{L}$  (Abb.88A).

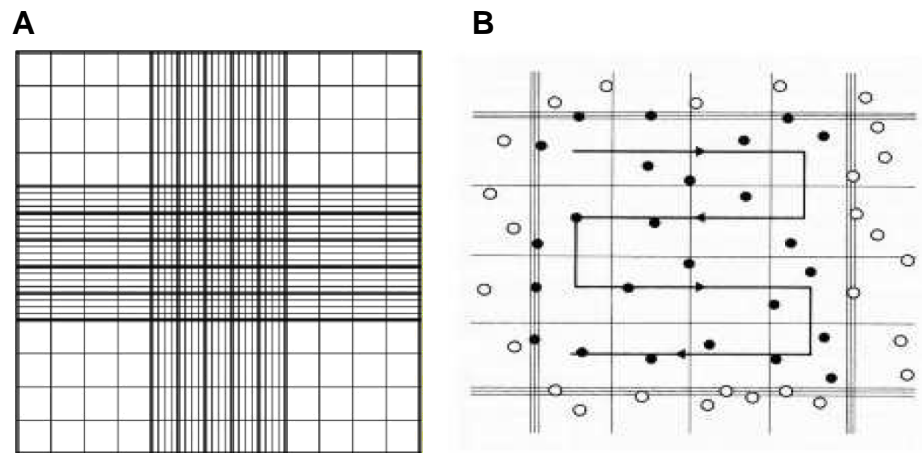


Abb.88: A: Netzeinteilung einer Neubauer-Zählkammer; B: Zählweise der Neubauer-Zählkammer,   
 ◦ nicht gezählte und • gezählte Zellen

[Lindl, 2008]

Es werden mindestens vier große Quadrate ausgezählt, dabei beginnt man meist oben links. Damit eine Mehrfachzählung der Zellen vermieden wird, werden nur die Zellen berücksichtigt, die auf den oberen und auf den linken Rand fallen (Abb.88 B).

Um die Zellkonzentration pro mL zu berechnen, wird der Wert mit dem Kammerfaktor von  $10^4$  multipliziert [Lindl, 2008].

**Berechnung der Zellzahl:**

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{Z}{4} \cdot VF \cdot 10^4$$

mit: Z: Zahl vitaler Zellen

$\frac{Z}{4}$ : Mittelwert

VF: Verdünnungsfaktor (Zellsuspension mit Trypanblau in dieser Arbeit 1:10 verdünnt)

[Lindl, 2008]

## 7.2 Inkubationsverfahren

Für die einzelnen durchgeführten Versuche wurden die in Tabelle 12 dargestellten Zellzahlen verwendet.

Tab.12: Schema der verwendeten Zellzahlen

	SRB Test	Comet Assay	Western Blot	ICE Assay	HDAC-Aktivitätstest
<b>Zelllinie</b>	HT29	HT29	HT29	HT29	HT29
<b>Zellzahl für 1 h Inkubation</b>	-	300.000 Zellen pro Petrischale	-	6 Mio. Zellen pro Petrischale	5000 Zellen pro Loch
<b>Zellzahl für 2 h Inkubation</b>	-	300.000 Zellen pro Petrischale	5 Mio. Zellen pro Petrischale	-	-
<b>Zellzahl für 24 h Inkubation</b>	30.000 Zellen pro Loch	200.000 Zellen pro Petrischale	4,5 Mio. Zellen pro Petrischale	-	-
<b>Zellzahl für 48 h Inkubation</b>	20.000 Zellen pro Loch	-	-	-	-
<b>Zellzahl für 72 h Inkubation</b>	4.500 Zellen pro Loch	-	-	-	-
<b>Material</b>	24-Loch Platten	Ø 60 mm Petrischalen	Ø 150 mm Petrischalen	Ø 150 mm Petrischalen	96-Loch Platte
<b>Medium</b>	10% FKS; 1% P/S	10% FKS; 1% P/S	10% FKS; 1% P/S	10% FKS; 1% P/S	10% FKS; 1% P/S

Von jeder Substanz wurde eine 100 mM Stammlösung angesetzt:

Tab.13: Schema der Herstellung der 100 mM Stammlösung

	Methyleugenol	1'-Hydroxy-methyleugenol	Methyleugenol-epoxid	3'-Oxo-methyl-isoeugenol
<b>Molare Masse</b>	178 g/mol	194 g/mol	194 g/mol	192 g/mol
<b>100 mM Stammlösung</b>	17,8 mg auf 1 mL DMSO	19,4 mg auf 1 mL DMSO	19,4 mg auf 1 mL DMSO	19,2 mg auf 1 mL DMSO

Aus der 100 mM Stammlösung der Testsubstanzen wurde folgende Verdünnungsreihe erstellt (Tab.14), dabei soll die eingesetzte DMSO Konzentration 0,5% im Endansatz betragen (1:200 Verdünnung).

Tab.14: Schema der verwendeten Verdünnungsreihe

Konzentration	eingesetzte Menge der Stammlösung	Menge an DMSO	Konzentration im Endvolumen
40 mM	40 µL	60 µL	200 µM
20 mM	20 µL	80 µL	100 µM
15 mM	15 µL	85 µL	75 µM
10 mM	20 µL	180 µL	50 µM
5 mM	50 µL (10 mM)	50 µL	25 µM
2 mM	20 µL (10 mM)	80 µL	10 µM
1 mM	10 µL (10 mM)	90 µL	5 µM
1 mM	20 µL (1 mM)	80 µL	1 µM
0,2 mM	20 µL (0,1 mM)	80 µL	0,1 µM
0,02 mM	20 µL (0,01 mM)	80 µL	0,01 µM
0,002 mM	20 µL (0,001 mM)	80 µL	0,001 µM

Zum Erreichen der jeweiligen Endkonzentration wurden die Lösungen je nach Versuch mit Medium verdünnt (Tab.15).

Tab.15: Eingesetzte Volumen zur Erreichung der Endkonzentration (0,5% DMSO)

Versuch	benötigtes Volumen	eingesetzte Menge der jeweiligen Konzentration
SRB	5 mL	25 µL
Comet Assay	5 mL	25 µL
Western Blot	15 mL	75 µL
ICE-Assay	15 mL	75 µL
HDAC-Aktivitätstest	1 mL	5 µL



## **7.3 Untersuchung zur Wachstumshemmung**

### **(Sulforhodamin B-Test)**

Zellwachstumshemmende Wirkungen von Testsubstanzen lassen sich schnell mit dem photometrischen Standardverfahren des SRB-Tests nachweisen. Dieser Test beruht auf der Anfärbung des Lebendproteins mit dem Xanthenfarbstoff Sulforhodamin B (Abb. 89). Unter schwach sauren Bedingungen binden die polaren Sulfongruppen des Farbstoffs elektrostatisch an die basischen Aminosäuren der Proteine. Der Farbstoff kann unter basischen Bedingungen wieder aus den Zellproteinen herausgelöst und bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden [Skehan *et al.*, 1990].

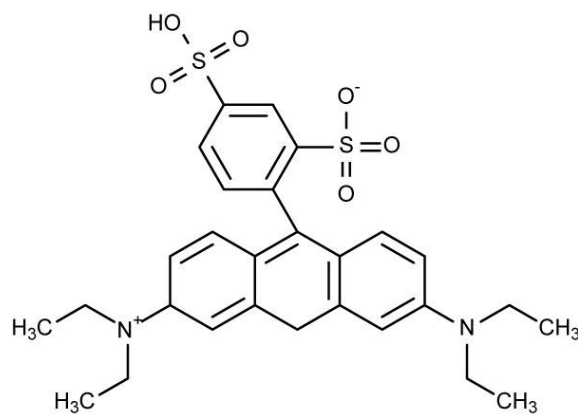


Abb.89: Strukturformel von Sulforhodamin B

## **Durchführung**

### ***Aussaat und Inkubation:***

Die Zellen werden in einer 24-Loch Platte ausgesät und für 48h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte anwachsen gelassen. Für die 24-stündige Inkubation werden 30.000 Zellen pro Loch, für 48-stündige Inkubation 20.000 Zellen pro Loch und für 72-stündige Inkubation 4.500 Zellen pro Loch ausgesät. Danach erfolgt die Substanzinkubation (Kap.7.2) eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO; 0,5%) wird mitgeführt.

### ***Fixierung:***

Die nach der Inkubation noch lebenden Zellen werden am Plattenboden fixiert und die überschüssigen Zell- und Mediumreste entfernt. Dazu wird die Substanzreaktion mit 100 µL Trichloressigsäure (TCA, 50%ig) pro Well abgestoppt. Die Zellen werden zur weiteren Fixierung 1h bei 4°C gelagert. Danach wird das TCA-haltige Medium verworfen und die Platten viermal vorsichtig unter kaltem fließenden Wasser gewaschen. Anschließend werden die Platten bei 60°C für 1h getrocknet.

### ***Färbung und Messung:***

Die fixierten Zellen werden mit 250 µL Sulforhodamin B-Reagenz (SRB; 4% in 1%iger Essigsäure) pro Well angefärbt und für 30 min im Dunkeln einwirken gelassen. Dann wird der nicht an das Zellprotein gebundene Farbstoff durch zweimaliges Waschen unter kaltem fließenden Wasser und zweimaligem Waschen mit 1%iger Essigsäure entfernt. Die Platten werden erneut bei 60°C für 1h getrocknet. Abschließend wird der Farbstoff mit Hilfe von 1mL pro Well Tris-Base (pH = 10,4) gelöst und die Platten mittels Mikrotiterplattenlesegerät photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm vermessen.

Um die wachstumshemmende Eigenschaft der Substanzen zu bestimmen, werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Lösungsmittelkontrolle und der Testsubstanzen berechnet. Die Mittelwerte der gemessenen Proben werden auf die Mittelwerte der DMSO-Kontrolle bezogen. Daraus wird letztlich der IC<sub>50</sub>-Wert ermittelt, der die Testsubstanzkonzentration angibt, bei der die Wachstumsrate 50% gegenüber der Lösungsmittelkontrolle beträgt.

**Lösungen und Reagenzien für SRB-Test:**

Trichloressigsäure (TCA)  
50 %ig (w/v) in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Essigsäurelösung  
1 %ig (v/v) in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Sulforhodamin B-Lösung  
0,4 %ig (w/v) in 1 %iger Essigsäurelösung

Tris-Base (pH 10)  
10 mM Tris in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

## **7.4 Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay)**

Die Einzelzellgelelektrophorese, auch wegen des Kometen-ähnlichen Schweifs der DNA-Fragmente als Comet Assay bezeichnet, ist eine Methode zur Detektion von DNA-Schäden auf Einzelzellniveau. Dabei handelt es sich um eine schnelle und sensitive Methode, die es ermöglicht verschiedene Formen von DNA-Strangbrüchen zu erfassen, wie z.B. Einzel- und Doppelstrangbrüche, alkali-labile Stellen sowie Strangbrüche durch oxidativen Stress.

Der Test ist auf die Beobachtungen von Ostling und Johanson zurückzuführen, die zeigten, dass auch strahlungsabhängige Doppelstrangbrüche mittels neutraler Elektrophorese detektierbar sind. So wurde gezeigt, dass sich Zellkerne mit geschädigter DNA während der Elektrophorese im Gegensatz zu Zellkernen mit ungeschädigter DNA in Richtung Anode ausbreiten [Ostling *et al.*, 1984]. Der Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen war durch dieses Verfahren nicht möglich, da die DNA im neutralen pH-Bereich als Doppelhelix und nicht in Einzelstränge separiert vorliegt. Eine erhöhte Sensitivität der Methode konnte durch die Änderung des pH-Bereichs ins Alkalische erreicht werden [Singh *et al.*, 1988]. So können in einem pH-Bereich > 13 Doppelstrang-, Einzelstrangbrüche, alkali-labile Stellen und DNA-crosslinks nachgewiesen werden. Nach neueren Erkenntnissen wird postuliert, dass keine DNA-Fragmente in das Agarose-Gel migrieren. Die intakte DNA liegt superspiralisiert vor; wenn die superspiralisierte DNA durch einen DNA-Strangbruch relaxiert wird, entsteht ein DNA-"Loop", welcher in einer Elektrophorese in Richtung Anode wandern kann. So wandern nicht die DNA-Fragmente, sondern relaxierte DNA-"Loops". Je mehr DNA-Brüche vorliegen, desto mehr "Loops" liegen relaxiert vor und desto mehr DNA erscheint im Kometen-Schweif, welcher als Maß für die DNA-Strangbruchrate steht [Azqueta und Collins, 2013]. Mittels Comet Assay können zudem mit spezifischen Modifikationen Schäden, die durch oxidativen Stress ausgelöst wurden, detektiert werden. Die dabei erforderliche Veränderung des Assays beruht auf der zusätzlichen Inkubation mit einem DNA-Reparaturenzym (Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (FPG)). Die oxidativen Schäden wie ringgeöffnete Purine und auch 8-oxo-Guanin werden durch die AP-Lyase-Aktivität des FPG ausgeschnitten (Abb.90). Die entstehenden Strangbrüche können mittels Comet Assay nachgewiesen werden [McArt *et al.*, 2009; Wasson *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2004].

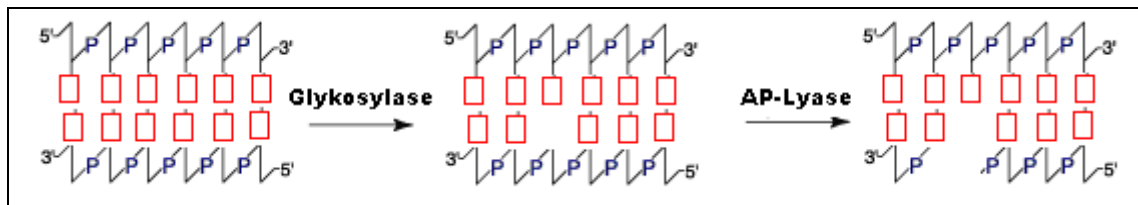


Abb.90: Funktionalität des FPG's  
[MODIFIZIERT NACH THIELEN, 2007]

Eine weitere Modifikation des Assays ist die Verwendung des Enzyms Endonuklease III [Collins *et al.*, 1993]. Dies ist eine Läsion-spezifische Endonuklease, welche es ermöglicht, oxidative Basen zu messen [Collins, 2013].

Nach der Inkubation der Zellen werden diese in ein Agarosegel eingebettet und anschließend lysiert. Durch die mindestens einstündige Lyse werden die Zellen permeabilisiert. Danach werden die lysierten Zellen einem Puffer mit pH > 13 ausgesetzt, wodurch eine Denaturierung der DNA in zwei Einzelstränge erfolgt. Bei der im Anschluss stattfindenden Elektrophorese wandern die DNA-Bruchstücke aus dem Zellkern in Richtung Anode, die intakte DNA verbleibt auf Grund der Größe im Kern. Dadurch erscheint ungeschädigte DNA unter dem Mikroskop als runder Punkt, während die geschädigte DNA einen Kometen-ähnlichen Schweif bildet (Abb.91).

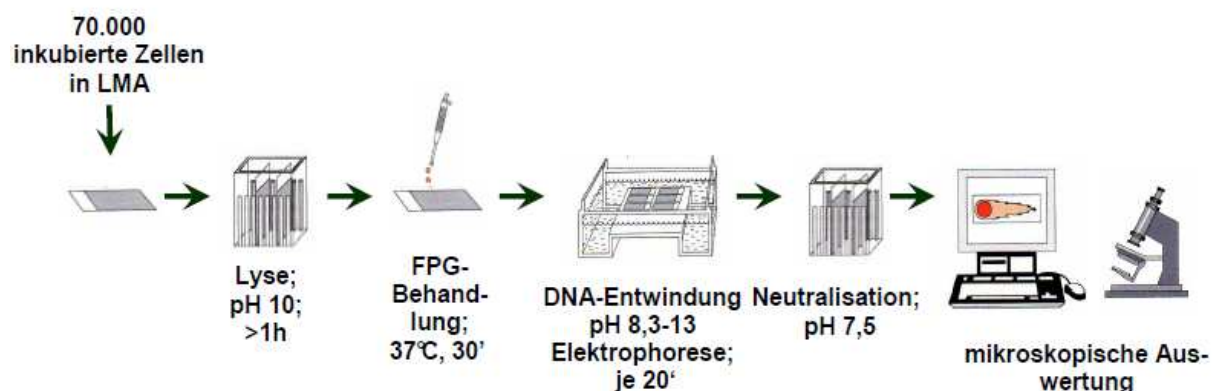


Abb.91: Ablauf der Arbeitsschritte der Einzelzellgelelektrophorese  
[THIELEN, 2007]

**Durchführung:*****Vorbereitung der Objektträger:***

Die Objektträger werden auf der angerauten Seite mit 40 µL NMA („Normal Melting Agarose“) mit einem Spatel gleichmäßig beschichtet. Nachdem die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet sind, werden zwei Gelkissen aus jeweils 65 µL NMA auf jeden Objektträger pipettiert und sofort mit einem 24 x 24 mm Deckglas abgedeckt. Anschließend werden die Objektträger mit einem Diamantschneider beschriftet. Zur objektiven Auswertung werden die Objektträger codiert.

Die fertigen Objektträger werden in Ethanolatmosphäre bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

***Aussaat und Inkubation der Zellen:***

Für die einstündige Inkubation werden 300.000 Zellen und 200.000 Zellen für die 24-stündige Inkubation in Petrischalen mit einem Durchmesser von 60 mm ausgestreut. Die Zellen werden für 72 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit anwachsen gelassen. Danach erfolgt die Substanzinkubation (Kap.7.2); mitgeführt wird eine Lösungsmittelkontrolle (DMSO; 0,5%) sowie Menadion (20 µM) als Positivkontrolle.

***Aufarbeitung der Zellen und Lyse:***

Nachdem die Zellen mit Substanz inkubiert worden sind, werden sie mit PBS gewaschen und mit 1 mL Trypsin vom Plattenboden abgelöst. Die Wirkung des Trypsins wird durch Zugabe von 1 mL DMEM (10% FKS) abgestoppt. Die Zellen werden nach mehrmaligem Abspülen in ein Reaktionsgefäß überführt.

***Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung:***

Sowohl die Zellzahl als auch die Viabilität wird mittels Trypanblaufärbung ermittelt. Dazu werden 50 µL Trypanblau vorgelegt und 50 µL Zellsuspension zugegeben. Die Zählung erfolgt mittels Neubauer-Zählkammer. Die Viabilität errechnet sich aus der Anzahl der lebenden Zellen geteilt durch die Gesamtzahl der Zellen. Die Viabilität sollte dabei den Wert von 80% nicht unterschreiten. Pro Inkubationsansatz werden 70.000 Zellen in vier Reaktionsgefäße gegeben und bei 4°C und 425 g für zehn Minuten zentrifugiert.

$$\text{Viabilität [\%]} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen (farblos)}}{\text{Anzahl lebender + toter (blau) Zellen}}$$

### **Einbetten in Agarose:**

Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in LMA („Low Melting Agarose“) aufgenommen und mehrmals resuspendiert. Diese Zellsuspension wird möglichst schnell auf das Gelkissen des Objektträgers gebracht und mit einem Deckglas fixiert. Die Aushärtung der Agarose erfolgt auf Eis.

### **Lyse:**

Anschließend werden die Deckgläser wieder entfernt und die Objektträger Rücken an Rücken in die Lysekammer mit vorgekühltem Lysepuffer gestellt. Die Lyse erfolgt über Nacht bei 4°C.

### **Inkubation mit FPG und Elektrophorese:**

Nach der Lyse werden die Objektträger in eine Elektrophoresekammer gelegt, die mit eiskaltem Elektrophoresepuffer gefüllt ist. Die Elektrophoresekammer wird verschlossen, abgedunkelt und die DNA für 20 Minuten denaturiert. Nach der Inkubation wird die Elektrophorese für 20 Minuten bei einer konstant angelegten Spannung von 25 V und einer Stromstärke von 300 mA, die durch Zugabe und Entnahme des Elektrophoresepuffers eingestellt wird, gestartet.

### **Neutralisation, Färbung und Auswertung:**

Die Objektträger werden nach der Elektrophorese entnommen und mit dem Rücken zueinander in eine Lysekammer gestellt. Zur erneuten Windung der DNA werden die Objektträger dreimal für fünf Minuten mit gekühltem Neutralisationspuffer gewaschen. Vor dem Auszählen müssen die Zellen mit 40 µL Ethidiumbromidlösung angefärbt werden. Die Auswertung wird mittels Fluoreszenzmikroskop und der Software Comet IV durchgeführt; pro Deckglas werden 50 Zellen ausgezählt. Die Quantifizierung der DNA-Schäden erfolgt über die Flächenbestimmung der Schweifintensität ("Tail intensity", TI [%]) der einzelnen Zellen, wobei der prozentuale Anteil der Fläche im Kometenschweif auf die Gesamtfläche der Zelle bezogen wird.

## **Lösungen und Reagenzien für Comet Assay**

NMA (Beschichtung der Objektträger)  
0,5% in PBS für Agarose

LMA (Suspendieren der Zellen)  
0,7% in PBS für Agarose

Elektrophoresepuffer-Stammlösungen  
200 g NaOH mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf 500 ml auffüllen  
14,9 g EDTA mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf 200 ml auffüllen

Elektrophoresepuffer-Gebrauchslösung  
45 mL NaOH-Lösung und 7,5 mL EDTA-Lösung mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf 1,5 L  
auffüllen  
Lagerung bei 4°C

Enzympuffer-Stammlösung (10x)  
9,5 g HEPES  
7,46 g KCl  
0,146 g EDTA  
0,2 g BSA  
mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf 1 L auffüllen; mit KOH auf pH 8,0 einstellen;  
aliquotiert auf 35 mL; Lagerung bei -20°C

Enzympuffer-Gebrauchslösung  
35 mL Enzympuffer-Stammlösung  
315 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Ethidiumbromid-Stammlösung  
10 mg Ethidiumbromid in 50 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Ethidiumbromid-Gebrauchslösung  
Stammlösung 1:10 verdünnt mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Lysepuffer-Stammlösung  
146,1 g NaCl  
37,2 g  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$   
1,2 g Tris  
in 1 L  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  lösen; mit NaOH auf pH 10 einstellen  
10 g *N*-Laurylsarcosin-Na-Salz

Lysepuffer-Gebrauchslösung  
89 mL Lysepuffer-Stammlösung  
10 mL DMSO  
1 mL Triton X-100



Nährmedium

500 mL DMEM "*high glucose*" (4,5 g/L) mit L-Glutamin  
10% FKS  
1% PenStrep  
Lagerung bei 4°C

Neutralisationspuffer

48,5 g Tris  
mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 1 L auffüllen; mit HCl auf pH 7,5 einstellen  
Lagerung bei 4°C

PBS-Stammlösung

4,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
180 g NaCl  
8,18 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 1L auffüllen; pH = 7,4 einstellen  
Lagerung bei 4°C

PBS-Gebrauchslösung

25 mL Stammlösung mit 475 mL H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnen  
bei 121°C für 20 Minuten autoklavieren

Trypsinlösung

## **7.5 Stabilitätsuntersuchung**

500.000 HT29 Zellen werden pro Petrischale (Ø 6 cm) in 5 mL DMEM ("*high glucose*") Medium ausgesät und für 48 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte kultiviert. Anschließend werden die Zellen für 0 Stunden, 1 Stunde und 24 Stunden mit 3'-Oxomethylisoeugenol bzw. 0 Stunden und 1 Stunde mit 3'-Hydroxymethylisoeugenol inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wird der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert. Dann werden die Überstände 1:1 mit eisgekühltem Aceton inklusive 200 µM Internem Standard (H<sub>2</sub>ME) versetzt. Die Proben werden dann für zwei Stunden bei -20°C inkubiert. Danach werden die Proben bei 4°C und 13000 g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird zur Stabilitätsmessung mittels HPLC eingesetzt.

### **Daten zur HPLC-Messung:**

Fließmittel A: 10 mM NH<sub>4</sub>OAc in H<sub>2</sub>O

Fließmittel B: Methanol

Säule: RP-18

Flow: 1,0 mL/min

Säulentemperatur: 35°C

Injektionsvolumen: 50 µL

UV-Detektion: 310 nm und 340 nm

## **7.6 Proteingewinnung**

Zur Untersuchung der Testsubstanzen mittels Western Blot Analyse müssen zunächst die Zellproteine gewonnen werden. Dies erfolgt nach verschiedenen Lyse-Methoden.

### **Methode 1:**

#### **Durchführung:** [Boettler *et al.*, 2011]

Nachdem die Zellen inkubiert wurden, wird das Medium entfernt und die Platten mit eiskühlem PBS gewaschen. Anschließend werden 0,7 mL PBS in jede Kulturschale pipettiert. Die Zellen werden abgeschabt und in einem 2 mL Eppendorfreaktionsgefäß gesammelt. Die gewonnene Zellsuspension wird für 3 Minuten bei 800 *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in Puffer A aufgenommen und mehrfach resuspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension für 15 Minuten auf Eis inkubiert und es werden 17 µL Nonidet-P40 (10%) pro Probe zugegeben. Das Lysat wird für 15 Sekunden gemixt und erneut für 3 Minuten bei 800 *g* und 4°C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand (Zytosol) wird in Eppendorfreaktionsgefäßen auf Eis gelagert. Das Pellet wird in 65 µL Puffer B aufgenommen und erneut für 15 Minuten auf Eis inkubiert, wobei hier alle zwei Minuten die Proben für 15 Sekunden gemixt werden. Abschließend werden die Lysate für 5 Minuten bei 15000 *g* und 4°C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand (Zellkern) wird auf Eis gelagert.

### **Lösungen und Reagenzien für die Proteingewinnung:**

Puffer A: (V = 100mL)

10 mM HEPES (pH 7,9) 0,238 g  
10 mM KCl 0,075 g  
0,1 mM EDTA 0,0029 g  
0,1 mM EGTA 0,0038 g  
1  $\mu$ M DTT (2  $\mu$ L auf 2 mL)  
1  $\mu$ M Protease-Inhibitor (2  $\mu$ L auf 2 mL)  
DTT und Protease-Inhibitor immer frisch zugeben  
(1 mM Stammlösung 1:1000 verdünnen)

Puffer B: (V = 100 mL)

20 mM HEPES (pH 7,9) 0,477 g  
0,4 mM NaCl 2,3 g  
1 mM EDTA 0,0292 g  
1 mM EGTA 0,038 g  
1  $\mu$ M DTT (2  $\mu$ L auf 2 mL)  
1  $\mu$ M Protease-Inhibitor (2  $\mu$ L auf 2 mL)  
DTT und Protease-Inhibitor immer frisch zugeben  
(1 mM Stammlösung 1:1000 verdünnen)

## **Methode 2:**

### **Durchführung**

Nachdem die Zellen mit den Testsubstanzen inkubiert wurden, wird das Medium verworfen und die Zellen mit eiskühlem PBS durch zweimaliges Waschen von Mediumresten befreit. Mit Hilfe von Papierstreifen werden Rückstände entfernt. Danach werden 200  $\mu$ L RIPA-Puffer zugetropft und die Zellen abgeschabt. Die Zellsuspensionen werden in Eppendorfreaktionsgefäßen auf Eis gesammelt. Anschließend werden die Proben für eine Minute gemixt und für 10 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### **Lösungen und Reagenzien für die Proteingewinnung:**

RIPA

790 mg Tris  
900 mg NaCl  
1 mM EDTA  
1 mL Igepal  
pH 7,4 einstellen; auf 100 mL mit Wasser auffüllen  
direkt vor Verwendung zugeben: 1  $\mu$ M DTT und 1  $\mu$ M Protease-Inhibitor

## **Methode 3:**

### **Durchführung**

Nachdem die Zellen mit den Testsubstanzen inkubiert wurden, wird das Medium verworfen und die Zellen mit eisgekühltem PBS durch zweimaliges Waschen von Mediumresten befreit. Mit Hilfe von Papierstreifen werden Rückstände entfernt. Danach werden 200 µL RIPA-Puffer zugetropft und die Zellen abgeschabt. Die Zellsuspensionen werden in Eppendorffreaktionsgefäßen auf Eis gesammelt. Danach werden die Proben durch eine dünne Kanüle geschert, so dass die Zellen vollständig lysiert sind. Dann werden die Proben für eine Minute gemixt und für 10 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### **Lösungen und Reagenzien für die Proteingewinnung:**

#### RIPA-Puffer

- 790 mg Tris
- 900 mg NaCl
- 1 mM EDTA
- 1 mL Igepal
- pH 7,4 einstellen; auf 100 mL mit Wasser auffüllen
- direkt vor Verwendung zugeben: 1 µM DTT und 1 µM Protease-Inhibitor

## **Methode 4 zur Immunpräzipitation:**

### **Durchführung**

4,5 x 10<sup>6</sup> HT29 Zellen werden in Petrischalen (d = 15 cm) ausgestreut und für 48 h in 10 % FKS-haltigem Medium anwachsen gelassen. Anschließend wird das Medium entfernt und die Zellen mit dem serumhaltigen Inkubationsmedium mit der jeweiligen Testsubstanz unter Anwesenheit von Katalase (100 units/mL) für 24 h inkubiert. Die Zellen werden auf Eis gelagert, das Medium verworfen und die Zellen zweimal mit eiskühlem PBS gewaschen. Danach werden zweimal 100 µL RIPA-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 250 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 % Igepal) auf den Zellrasen getropft, die Zellen werden abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wird die Zellsuspension eine Minute gemixt und für 10 Minuten bei 4°C und 14000 g zentrifugiert. Der Überstand wird zur Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt. 400 µg Gesamtprotein werden zur Immunpräzipitation verwendet.

### **Lösungen und Reagenzien für die Proteingewinnung:**

#### RIPA-Puffer

- 50 mM Tris
- 250 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 1% Igepal
- pH 7,4 einstellen; auf 100 mL mit Wasser auffüllen
- direkt vor Verwendung zugeben: 1 µM DTT und 1 µM Protease-Inhibitor

## **7.7 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Methode zur Bestimmung des Zellproteins nach Bradford beruht auf der Anfärbung der Proteine durch den Farbstoff Coomassie-Brillantblau G250 (Abb.92). Durch eine unspezifische Komplexbindung kationischer und nichtpolarer, hydrophober Seitenketten von Proteinen an das Färbereagenz, wird im sauren Milieu das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm verschoben [Bradford, 1976].

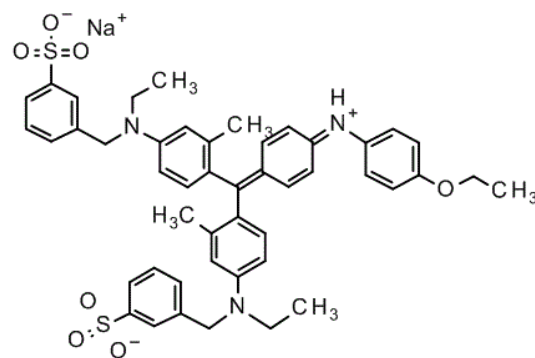


Abb.92: Strukturformel von Coomassie-Brillantblau G250

### **Durchführung:**

Zur Quantifizierung des Proteingehalts wird eine Eichgerade im Konzentrationsbereich 0,1-1,5 mg/mL mit Hilfe eines BSA- ("bovine serum albumin") Proteinstandards der Konzentration 2 mg/mL erstellt (Tab.16). Die Proben werden 1:10 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> verdünnt. Als Kontrollwerte werden sowohl der Nullwert (H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) als auch der zur Aufarbeitung der Zellproteine verwendete Puffer mitgeführt. 10 µL der Proben und 10 µL der Kontrollen werden in Duplikaten in eine 96-Well Platte pipettiert. Anschließend werden jeweils 200 µL Bradford-Reagenz (1:4 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) zugegeben. Die Platte wird nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei 595 nm im Mikrotiterplattenlesegerät photometrisch vermessen. Der Proteingehalt der Proben wird mit linearer Regression über die Kalibriergerade nach Subtraktion des Nullwertes (10 µL Wasser in 1 mL Bradford-Reagenz) berechnet.

Tab.16: Standardreihe im Konzentrationsbereich von 0,1-1,5 mg/mL BSA-Standardlösung (2 mg/mL)

0,1 mg/ mL:	10 µL BSA + 190 µL Wasser
0,2 mg/mL:	20 µL BSA + 180 µL Wasser
0,4 mg/mL:	40 µL BSA + 160 µL Wasser
0,5 mg/mL:	50 µL BSA + 150 µL Wasser
0,6 mg/mL:	60 µL BSA + 140 µL Wasser
0,8 mg/mL:	80 µL BSA + 120 µL Wasser
1,0 mg/mL:	100 µL BSA + 100 µL Wasser
1,2 mg/mL:	120 µL BSA + 80 µL Wasser
1,5 mg/mL:	150 µL BSA + 50 µL Wasser

**Lösungen und Reagenzien für die Proteinbestimmung nach Bradford:**

Bradford-Reagenz

BSA-Proteinstandard



## **7.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot**

Die SDS-Gelelektrophorese ist ein Standardverfahren zur Auftrennung von Proteinen. Mit Hilfe der Gelelektrophorese ist es möglich, geladene Teilchen (Proteine) im elektrischen Feld aufzutrennen. Die Proteine werden vor der Auftrennung mit SDS-Probenpuffer erhitzt, um sie zu denaturieren. Durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden die Disulfidbindungen der multimeren Proteine reduktiv gespalten, so dass die Proteine sich auffalten und als Monomere vorliegen. Weiter wird die Eigenladung der Proteine durch die Zugabe des anionischen Detergenz SDS maskiert, da SDS mit den Proteinen einen Komplex mit negativer Oberflächenladung bildet. Hierdurch entsteht ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis, welches die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht ermöglicht. Es besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und der relativen Migrationsstrecke ins Gel. So können in der Gelelektrophorese Markerproteine mitgeführt werden, so dass anhand des Molekulargewichtes die Proteine unterschieden werden können bzw. das Molekulargewicht der Proben bestimmt werden kann. Hier fand eine diskontinuierliche Gelelektrophorese im Vertikalsystem statt. Die Diskontinuität beruht auf der unterschiedlichen Porengröße zwischen Sammelgel und Trenngel sowie auf den unterschiedlichen pH-Werten der Gele, wodurch eine höhere Bandenschärfe erreicht werden kann [Lottspeich, 1998; Luttmann *et al.*, 2006]. Das Sammelgel ist im Gegensatz zum Trenngel weitporiger und hat einen pH-Wert von 6,8. Das enthaltene Glycin liegt als Zwitterion vor und wandert im Vergleich zu den Chlorid-Ionen langsamer. Dadurch baut sich zwischen den Laufronten eine Potentialdifferenz auf und es bilden sich Proteinstapel, die mit gleicher Geschwindigkeit im Gel wandern. Durch das engporige Trenngel mit dem pH-Wert von 8,8 erhält das Glycin eine negative Ladung und wandert somit schneller im Trenngel als im Sammelgel. Durch die engere Porengröße des Trenngels kommt es zu einer Verdichtung der Proteinstapel, wodurch die Proteine nach ihrem Masse-Ladungsverhältnis aufgetrennt werden.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgt die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Dieser Vorgang wird als „Western Blotting“ bezeichnet. Mittels des „*Semi-Dry*“ Verfahrens, bei dem die Nitrozellulosemembran, die Whatmanpapiere und das Gel zuvor in Blotting-Puffer äquilibriert worden sind,

werden durch Anlegung eines elektrischen Feldes (70 mA/Gel für 75 Minuten) die Proteine auf die Membran übertragen. Der Aufbau eines „Semi-Dry“-Blots ist in Abb. 93 dargestellt.

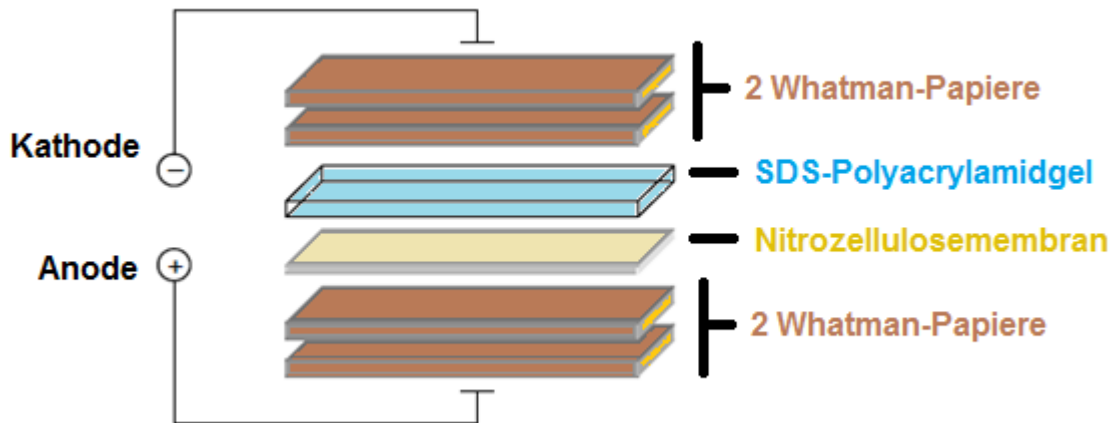


Abb.93: Aufbau einer „Semi-Dry“-Blot Apparatur  
[in Anlehnung an Lottspeich, 1998 und Luttmann *et al.*, 2006]

Danach wird die Membran im „Blockingpuffer“ (eine Stunde bei Raumtemperatur, 5% Milchlösung oder BSA-Lösung) geschwenkt, hierdurch können unspezifische Bindungsstellen für den Erstantikörper besetzt werden. Anschließend erfolgt die Inkubation mit Antikörpern; dabei wird zunächst mit einem Erstantikörper inkubiert (4°C über Nacht) und danach mit einem Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase*)-gekoppelten Zweitantikörper, der den Erstantikörper spezifisch erkennt. Die Meerrettich-Peroxidase des Zweitantikörpers katalysiert dabei die Reaktion zwischen Luminol und  $H_2O_2$  der Luminol-Reagenzlösung, welche zur Detektion der Proteinbanden verwendet wird. Bei dieser Chemolumineszenz-Reaktion werden Luminol und  $H_2O_2$  zu angeregtem 3-Aminophthalat umgewandelt (Abb.94), welches unter Abgabe von Licht in den energetischen Grundzustand zurückfällt [Luttmann *et al.*, 2006; Albrecht, 1990; Lottspeich, 1998]. Die Detektion erfolgt abschließend am Lumi-Imager.

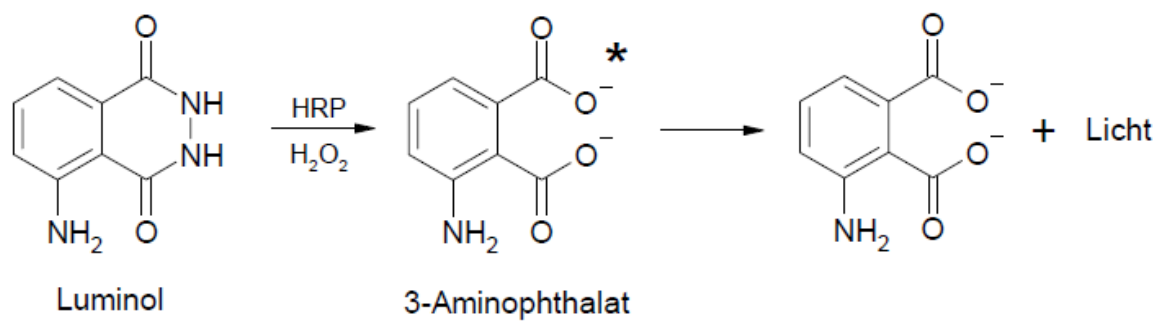


Abb.94: Chemolumineszenzreaktion  
[Roesky und Möckel, 1996]

**Durchführung:*****Gießen des Trenngels:***

Die Glasplatten werden vor dem Zusammenbau im Gießstand mit Ethanol entfettet und danach nach Anleitung im Gießstand befestigt. Das noch flüssige Gel wird (Zusammensetzung siehe Tab. 17) zwischen die beiden Glasplatten pipettiert. Zum Aushärten wird das Trenngel mit Butanol überschichtet.

Tab. 17: Zusammensetzung des Trenngels

	<b>7%ig</b>	<b>10%ig</b>	<b>12%ig</b>	<b>17%ig</b>
<b>H<sub>2</sub>O (bidest)</b>	2,54 mL	2,05 mL	1,72 mL	0,89 mL
<b>Tris/HCl (1,5M)</b>	1,23 mL	1,23 mL	1,23 mL	1,23 mL
<b>AA</b>	1,15 mL	1,65 mL	1,97 mL	2,8 mL
<b>SDS (10%)</b>	49,2 µL	49,2 µL	49,2 µL	49,2 µL
<b>APS</b>	24,6 µL	24,6 µL	24,6 µL	24,6 µL
<b>TEMED</b>	2,46µL	2,46µL	2,46µL	2,46µL

***Gießen des Sammelgels:***

Zunächst wird das Butanol über dem ausgehärteten Trenngel entfernt. Reste werden mit Wasser und einem Tuch beseitigt. Der Gelkamm wird mit Ethanol entfettet. Anschließend werden die verschiedenen Komponenten des Sammelgels (4%ig) pipettiert (Zusammensetzung siehe Tab. 18) und über das Trenngel gegossen. Der Gelkamm wird zur Ausbildung der späteren Geldaschen eingesetzt.

Tab.18: Zusammensetzung des Sammelgels

<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,2 mL
<b>Tris/HCl (0,5M)</b>	0,5 mL
<b>AA</b>	0,25 mL
<b>SDS (10%)</b>	20 µL
<b>APS</b>	20 µL
<b>TEMED</b>	2 µL

**Elektrophorese:**

Nachdem die Zellen lysiert wurden und die Proben auf ihren Proteingehalt nach Bradford bestimmt wurden, werden die Proben mit 20 µL SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 bzw. 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend wird die Elektrophoresekammer vorbereitet, indem die Gele in die Kammer eingesetzt werden und die Kammer mit Laufpuffer befüllt wird. Die Gelkämme werden vorsichtig aus dem Sammelgel entfernt. Danach werden die entstandenen Geltaschen mit den Proben befüllt und ein Proteinmolekulargewichtsmarker wird in eine Tasche pipettiert. Anschließend wird die Elektrophorese mit 100 V gestartet. Sobald die Proben das Trenngel erreicht haben, wird die Spannung auf 140 V erhöht.

**Western Blot:**

Es werden (vier Stück pro Gel) Whatmanpapiere und die Nitrozellulosemembran im Blottingpuffer für ca. eine Stunde bei 4°C äquilibriert. Nach der Elektrophorese werden die Gele aus den Glasplatten vorsichtig entnommen und auch für ca. 2 Minuten im Blottingpuffer äquilibriert. Danach erfolgt der Aufbau des sogenannten "Sandwich Blots". Dazu werden zwei Whatmanpapiere auf die Unterseite der Blottingapparatur gelegt, darüber die Membran. Auf die Membran kommt das Gel, welches mit weiteren zwei Whatmanpapiere abgedeckt wird. Entstandene Luftblasen werden durch eine Holzrolle entfernt. Anschließend wird bei 70 mA je Gel über 75 Minuten geblottet.

**Blocken:**

Nach dem Blotting-Verfahren wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur im Blockingreagenz (Milchpulver) geschwenkt. Hier werden alle unspezifischen Bindungen auf der Membran geblockt.

**Inkubation mit Erstantikörper:**

Danach erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper. Dazu werden 5 mL BSA- oder Blockingreagenz mit einer spezifischen Menge an Erstantikörper versetzt. Die Membran wird in ein Reaktionsrohr gerollt und die Erstantikörperlösung wird zugegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfmixer.

Tab.19: Primärantikörper

Antikörper	Konzentration	Lösung	Dauer der Inkubation
SUMO E1	1:200	Milch + TBST	über Nacht
<i>mouse-anti</i> -HDAC 1	1:1000	Milch + TBST	über Nacht
<i>mouse-anti</i> -HDAC 2	1:1000	Milch + TBST	über Nacht
<i>mouse-anti</i> -HDAC 3	1:1000	Milch + TBST	über Nacht
<i>rabbit-anti</i> -HDAC 4	1:1000	Milch + TBST	über Nacht
<i>rabbit-anti</i> -HDAC 5	1:1000	Milch + TBST	über Nacht
<i>rabbit-anti</i> -HDAC 6	1:1000	Milch + TBST	über Nacht
<i>rabbit-anti</i> -p-ATM	1:1000	BSA + TBST	über Nacht
<i>rabbit-anti</i> -p-ATR	1:1000	BSA + TBST	über Nacht
<i>rabbit-anti</i> -p-CHK1	1:1000	BSA + TBST	über Nacht
<i>rabbit-anti</i> -p-CHK2	1:1000	BSA + TBST	über Nacht
<i>mouse-anti</i> -p-p53	1:1000	BSA + TBST	über Nacht
<i>rabbit-anti</i> -p-BRCA 1	1:1000	BSA + TBST	über Nacht
<i>rabbit-anti</i> - $\gamma$ H2AX	1:1000	Milch + TBST	über Nacht
<i>mouse-anti</i> - $\alpha$ -Tubulin	1:2000	Milch + TBST	über Nacht

***Inkubation mit Zweitantikörper und Detektion:***

Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wird die Membran dreimal für 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgt die Inkubation mit 5 mL Blockingreagenz oder BSA-Lösung mit 2,5 µL Zweitantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Überkopfmixer. Danach wird die Membran erneut dreimal für 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird das Luminolreagenz vorbereitet. Dazu werden 2 mL des Reagenz A mit 2 mL Reagenz B vermischt und die Membran für ca. 1 Minute im Luminolreagenz inkubiert. Anschließend wird die Membran am LAS detektiert.

***"Strippen" von Membranen:***

Nach einer Detektion können die gebundenen Antikörper mittels Stripping-Puffer entfernt werden, um eine Detektion weiterer Proteine auf derselben Membran zu ermöglichen. Hierzu wird die Membran für 20 Minuten im 50°C warmen Wasserbad im Stripping-Puffer inkubiert. Anschließend wird die Membran sechsmal für jeweils fünf Minuten mit 0,1% TBST gewaschen. Danach werden die unspezifischen Bindungsstellen mit Blocking Reagenz geblockt und ein weiterer Immunoblot durchgeführt.

**Lösungen und Reagenzien für die SDS-Gelelektrophorese und Western Blot:**

1,5 mM Tris/HCl pH 8,8

18,17 g auf 100 mL Wasser

0,5 mM Tris/HCl pH 6,8

6,06 g auf 100 mL Wasser

APS (Ammoniumperoxodisulfat ; ca.10%)

Reaktionsgefäß ein Drittel mit APS füllen und 1 mL Wasser lösen

10% SDS

5 g auf 50 mL Wasser

10x Laufpuffer: (V = 2 L)

2 M Glycin 300 g

250 mM Tris/HCl pH 8,3 60,57 g

1% SDS 20 g

1x Laufpuffer: 200 mL + 1800 mL Wasser

20x TBS: (V = 2 L)

2,6 M NaCl 303,9 g

0,4 M Tris/HCl pH 7,6 96,9 g

2x Blotting Puffer: (V = 2 L)  
78 mM Glycin 11,7 g  
96 mM Tris/HCl 23,3 g  
0,074% SDS 1,48 g  
40% Methanol 800 mL

Waschlösung: (V = 5 L)  
1x TBS 250 mL  
0,3% Tween-20 15 mL

Blocking-Reagenz: (V = 200 mL)  
1x TBS 10mL  
0,1% Tween-20 200µL  
5% Milchpulver (bzw.BSA) 10g  
Blocking-Reagenz muss meist wöchentlich Frisch angesetzt werden

6x SDS-Probenpuffer: (V = 100 mL)  
50 mL 0,5 M Tris pH 6,8  
40 mL Glycerin  
1,24 g SDS  
0,16 g Bromphenolblau  
Zu jeweils 1mL aliquotieren  
5%  $\beta$ -Mercaptoethanol (immer“ frisch“ zugeben) 52,6 µL

Stripping Puffer [Ufelmann, 2013]  
Tris (62,5 mM) 757 mg  
SDS (20 %ige Lösung) 2% (10 mL)  
 $\beta$ -Mercaptoethanol (100 mM) 700 µL  
bidest. H<sub>2</sub>O 100 mL  
pH 6,7



## **7.9 Immunpräzipitation**

Eine Antigen-Antikörper-Reaktion entsteht bei der Vermischung von löslichen Antigenen mit spezifischen Antikörpern. Diese Reaktion führt zu einem Verlust der Löslichkeit der Antigen-Antikörper-Komplexe und einer Trübung mit nachfolgender Sedimentation. Dieser Vorgang wird Immunpräzipitation genannt (Abb.106). Eine Präzipitation ist nur möglich, wenn wenigstens drei, in manchen Fällen zwei antigene Determinanten auf ein Antigen kommen [Lottspeich, 1998]. Mit Hilfe einer Immunpräzipitation ist es möglich, eine Protein-Protein-Wechselwirkung nachzuweisen. Hierzu werden die Zellen lysiert und ein Antikörper hinzugefügt, welcher spezifisch an eines der Proteine bindet. Über diesen Antikörper wird das gesuchte Protein samt Interaktionspartner präzipitiert. Dazu werden Protein A und/oder Protein G verwendet, welche mit hoher Spezifität an die Fc-Region der meisten Säugetier-Immunglobuline binden. Sogenannte Beads aus Sepharose werden mit diesen Proteinen beschichtet, um die Antikörper-Protein-Komplexe an sich zu binden. Durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte werden die Komplexe isoliert und von anderen Proteinen befreit. Durch Denaturierung werden die Proteine von den Beads entfernt und ein Nachweis mittels Western Blot Analyse durchgeführt [Masters, 2004; Kaboord und Perr, 2008; Dickson, 2008].

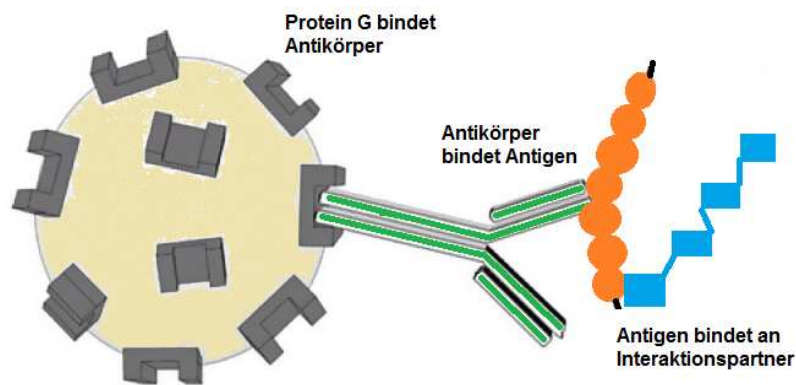


Abb.95: Prinzip der Immunpräzipitation  
[in Anlehnung an Kaboord und Peer, 2008]

**Durchführung:**

Pro Probe werden 50 µL Protein-G-Sepharose eingesetzt. Diese wird bei 1000 g und 4°C für eine Minute abzentrifugiert. Danach wird die Protein-G-Sepharose zweimal mit eiskühlem PBS gewaschen und in doppeltem Volumen an PBS aufgenommen. Zur Protein-G-Sepharose wird im Verhältnis 1:15 der HDAC 1-Antikörper zugegeben. Die Lösung wird für eine Stunde bei 4°C belassen. Dann werden 50 µL der Antikörper-gekoppelten Protein-G-Sepharose mit dem Gesamtprotein jeder Probe versetzt und das Volumen im Reaktionsgefäß auf 1 mL mit PBS eingestellt. Die Proben werden abschließend über Nacht bei 4°C auf dem Rüttelschüttler inkubiert.

Die Sepharose wird für zwei Minuten bei 7000 g und 4°C abzentrifugiert. Die Beads werden einmal mit 300 µL Präzipitationspuffer (35 mM HEPES, 5 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 M Sucrose, 0,5% Triton X, pH 7,1) und zweimal mit 300 µL PBS gewaschen. Danach wird die Sepharose mit 20 µL SDS-Probenpuffer (6x) versetzt und für zehn Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend erfolgt die SDS-PAGE (12% Polyacrylamidgel) mit je 15 µL jeder Probe pro Geltasche.

**Lösungen und Reagenzien für die Immunpräzipitation:**

Protein-G-Sepharose

Präzipitationspuffer

35 mM HEPES  
5 mM EGTA  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,2 M Sucrose  
0,5% Triton X  
pH 7,1

6x SDS-Probenpuffer: (V = 100 mL)

50 mL 0,5 M Tris pH 6,8  
40 mL Glycerin  
1,24 g SDS  
0,16 g Bromphenolblau  
Zu jeweils 1mL aliquotieren  
5% β-Mercaptoethanol (immer "frisch" zugeben) 52,6 µL

## 7.10 HDAC-Aktivitätsmessung

Die HDAC-Aktivität wurde mit Hilfe eines "Cayman's HDAC cell-based Assay Kit" gemessen. Dieser Aktivitätstest beruht auf der Reaktion zwischen einem HDAC-Substrat, einem Boc-Lys(AC)-AMC, und verschiedenen Lysin-spezifischen Deacetylasen, darunter auch der HDAC 1-Komplex. Die Fluoreszenz des gebildeten deacetylierten Reaktionsproduktes kann mittels Mikrotiterplattenlesegeräte gemessen werden (Abb. 96).

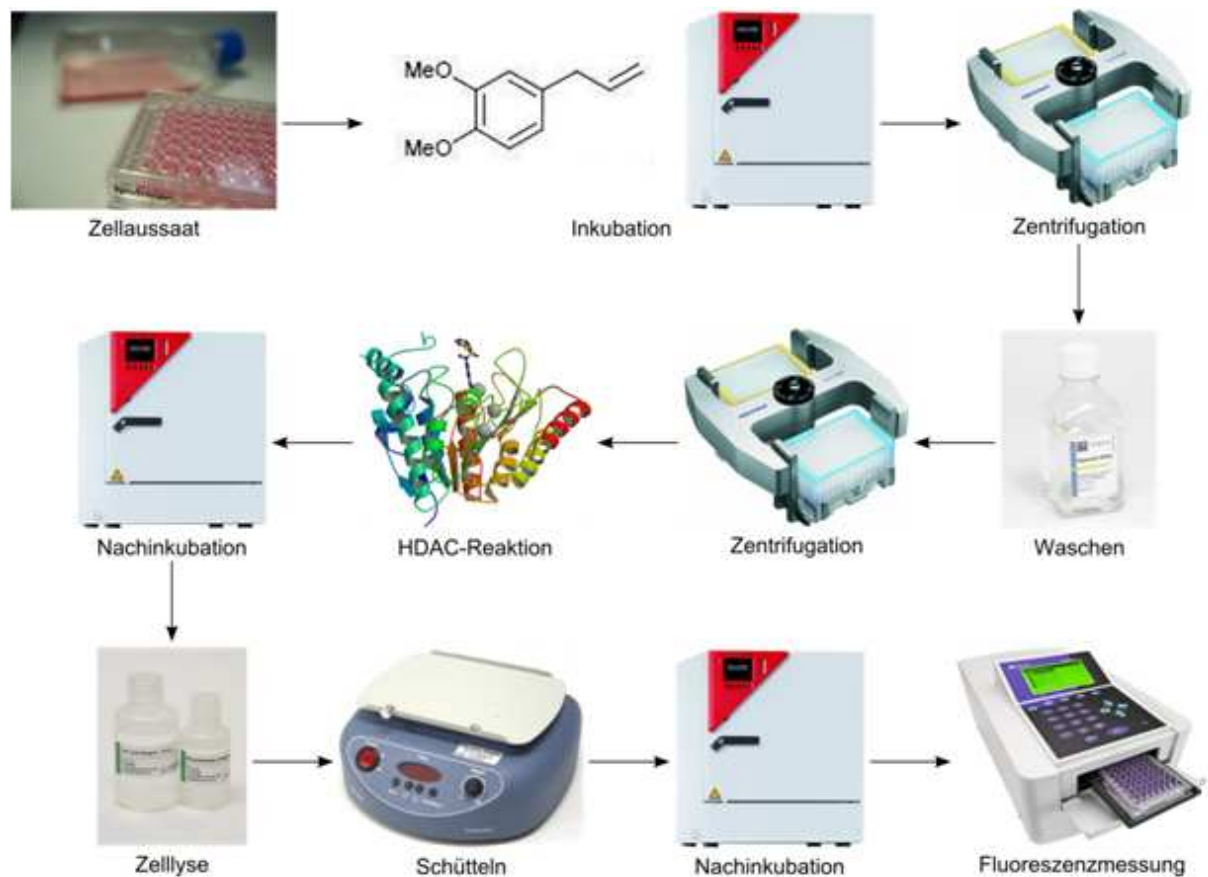


Abb.96: Schematische Durchföhrung des HDAC-Aktivitätsassays

**Durchführung:**

5000 HT29 Zellen werden in einer schwarzen 96-Mikrotiterloch Platten in 100 µL Medium ausgesät und für 48h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchte kultiviert. Anschließend werden die Zellen mit den Testsubstanzen für 24h inkubiert. Nach der Inkubation werden die Platten bei 500 g zentrifugiert und das Medium verworfen. 200 µL Assay Puffer werden in jedes Well pipettiert und die Platten werden erneut bei 500 g zentrifugiert. Dann werden 90 µL DMEM Kulturmedium oder 80 µL Trichostatin A plus 10 µL DMEM-Medium zugegeben. Danach erfolgt die Zugabe von 10 µL des HDAC-Substrates in jedes Well. Die Platten werden für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend werden 50 µL der Lyse/Entwickler-Lösung zupipettiert. Die Platten werden für zwei Minuten auf einem Plattenschüttler gemixt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Abschließend erfolgt die Fluoreszenzmessung in einem Mikrotiterplattenmessgerät bei den Wellenlängen 340-360 nm und 440-460 nm.

Um die HDAC-Aktivität zu bestimmen, werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Lösungsmittelkontrolle, der Positivkontrolle und der Testsubstanzen berechnet. Die Mittelwerte der gemessenen Proben werden auf die Mittelwerte der Lösungsmittelkontrolle bezogen.

**Lösungen:**

HDAC-Assay Puffer

HDAC deacetylierter Standard

Trichostatin A als positive Kontrolle

HDAC 1

HDAC-Substrat

HDAC-Lyse/Entwickler Mix

## **7.11 Plasmid-Maxipräparation**

Beim Relaxationsassay wird superspiralisierte Plasmid-DNA pUC18 als Substrat benötigt. Die Isolierung dieses Plamids erfolgt aus transformierten *Escherichia coli* DH5α mit Hilfe eines QIAGEN Plasmid-Maxi-Kits. Die Plasmide werden durch alkalische Lyse und Aufreinigung an Anionentauscher-Harz- Säulen gewonnen. Die Plasmid-Maxipräparation wird an Hand des QIAGEN-Kits durchgeführt.

### **Durchführung:**

- in zwei Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) werden 5 mL LB-Medium und 5 µL Ampicillin (500 mg/mL) gegeben und mit einigen Mikrolitern (5 µL und 10 µL) eines Glycerolstocks von *E.coli* DH5α angeimpft
- die Kulturlösung wird in einem Bakterieneschüttler für acht Stunden bei 37°C und 160 U/min inkubiert
- 200 mL des LB-Mediums und 200 µL Ampicillin werden mit 1-2,5 mL Kulturlösung der Vorkultur beimpft und über Nacht bei 37°C und 160 U/min im Bakterieneschüttler inkubiert
- die Kultur wird in Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und bei 4°C und 5500 g für 15 Minuten zentrifugiert
- der Überstand wird entfernt und die Pellets in 10 mL Resuspensionspuffer aufgenommen
- danach werden 10 mL Lysepuffer zugegeben, vorsichtig resuspendiert und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert
- dann erfolgt die Zugabe von 10 mL Neutralisationspuffer und die Inkubation für 15- 20 Minuten auf Eis
- die Proben werden bei 4°C und 20000 g für 30 Minuten zentrifugiert
- anschließend wird die QIAGEN-Säule mittels 10 mL Equilibrierungspuffer äquibriert
- der Überstand wird abfiltriert und auf die Säule gegeben und zweimal mit dem Waschpuffer gewaschen

- die gebundene Plasmid-DNA wird mit 15 mL Elutionspuffer eluiert
- Präzipitation der DNA durch Zugabe von 10,5 mL Isopropanol und anschließende Mischung und Abfiltration
- das Pellet wird mit 5 mL 70%igem Ethanol gewaschen und erneut abfiltriert
- das Pellet wird mit einer entsprechenden Spritze über ein Filter getrocknet
- Nach der Bestimmung der Reinheit und Konzentration am Nanodrop wird die pUC18 Plasmid-DNA bei -20°C gelagert

### **Lösungen und Reagenzien für die Plasmidmaxipräparation:**

#### LB-Medium

10 g Bacto-Trypton  
5 g Hefeextrakt  
10 g NaCl  
pH 7,0 mit Wasser auf 1 L auffüllen, autoklavieren

#### Resuspensionspuffer

50 mM Tris/HCL, pH 8,0  
10 mM EDTA  
100 µg/mL RNase A

#### Lysepuffer

200 mM NaOH  
1% (w/v) SDS

#### Neutralisationspuffer

3 M Kaliumacetat, pH 5,5

#### Equilibrierungspuffer

750 mM NaCl  
30 mM 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS), pH 7,0  
15% (v/v) Isopropanol  
0,15% (v/v) Triton-X 100

#### Waschpuffer

1 M NaCL  
50 mM MPOS, pH 7,0  
15% (v/v) Isopropanol

#### Elutionspuffer

1,25 M NaCl  
50 mM Tris/HCl, pH 8,5  
15% (v/v) Isopropanol

Zur Testung der pUC18 Plasmid-DNA wird die pUC18 entsprechend der Messung am Nanodrop mit Wasser verdünnt und mit 2 µL Ladepuffer versetzt.

86,3 ng/µL DNA: 2,9 µL DNA + 7,1 µL Wasser

115,4 ng/µL DNA: 2,17 µL DNA + 7,83 µL Wasser

101,2 ng/µL DNA: 2,47 µL DNA + 7,53 µL Wasser

86,0 ng/µL DNA: 2,9 µL DNA + 7,1 µL Wasser

Dann erfolgt eine Gelelektrophorese für zwei Stunden bei 60 V in 1% Agarosegel. Danach wird das Gel im Ethidiumbromidbad angefärbt und am Lumi-Imager detektiert.

## 7.12 Relaxationsassay

Die katalytische Aktivität von Topoisomerasen kann im Relaxationsassay bestimmt werden, in dem Topoisomerasen superspiralisierte Plasmid-DNA in die relaxierte bzw. entspannte Form überführen. Im Speziellen wird im Relaxationsassay die Fähigkeit einer Testsubstanz getestet, die Topoisomerase I zu hemmen. Dieses Enzym kann durch Einführung eines Einzelstrangbruchs im Zuckerphosphat-Rückgrat der DNA superspiralisierte DNA entspannen (Abb.97). Durch Agarosegelelektrophorese ist es möglich, die beiden Plasmidformen voneinander zu trennen. Die superspiralisierte Form migriert auf Grund ihrer Struktur weiter ins Gel als die relaxierte Form. Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgen die Anfärbung des Gels mit Ethidiumbromid und die abschließende Detektion im Lumi-Imager.

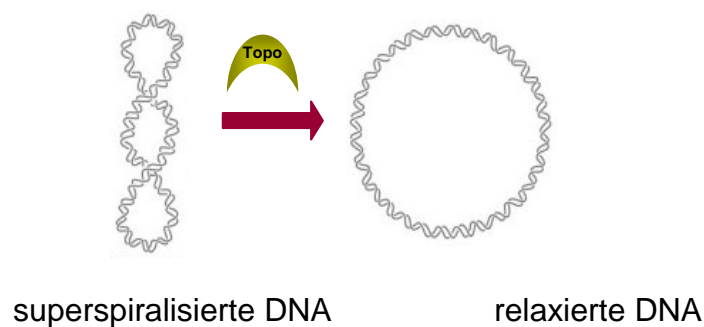


Abb.97: Relaxation der DNA durch Topoisomerase I  
[modifiziert nach Esselen *et al.*, 2009]

Sowohl Topoisomerase I als auch Topoisomerase II können superspiralisierte DNA in relaxierte DNA überführen. Topoisomerase II ist jedoch ATP-abhängig, so dass dieser Test in Abwesenheit von ATP durchgeführt wird, wodurch nur die Aktivität der Topoisomerase I erfasst wird. Mit Hilfe dieses Tests ist es möglich zu überprüfen, ob nach Zugabe der Testsubstanz die Topoisomerase I noch die DNA relaxiert.



**Durchführung:**

250 ng superspiralisierte pUC18-Plasmid-DNA werden mit Topoisomerase I versetzt. Die Proben werden bei 37°C für 30 min inkubiert. Durch Zugabe von 3 µL SDS-Lösung und 3 µL Proteinase K-Lösung und erneuter Inkubation für 30 min bei 37°C wird die Reaktion gestoppt und das Enzym denaturiert. Anschließend werden die Proben mit 6 µL Ladepuffer versetzt und 17 µL jeder Probe in die Geltasche des Agarosegels pipettiert (Tab. 20). Die Elektrophorese erfolgt bei 60 V über drei Stunden. Abschließend wird das Gel im Ethidiumbromid-Wasserbad für ca. 10 min angefärbt, in Wasser für einige Minuten gewaschen und die Fluoreszenz bei 560 nm mittels Lumi-Imager gemessen.

Tab.20: Pipettierschema für Relaxationsassay

	Kontrolle	Substanz
H <sub>2</sub> O	17 µL	16 µL
Saltmix I	3 µL	3 µL
KCl	3 µL	3 µL
Tris-Puffer	3 µL	3 µL
pUC18	3 µL	3 µL
DMSO oder Substanzlsg.	1 µL	1 µL
Topoisomerase I	-	1 µL

**Lösungen und Reagenzien für den Relaxationstest:**

Saltmix I

- 100 mM  $\text{MgCl}_2$
- 5 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT)
- 5 mM EDTA
- 0,3 mg/mL BSA

Tris/HCl

- 100 mM Tris (pH 7,9)

50 x TAE-Puffer

- 242 g Tris Base
- 57,1 mL Eisessig
- 100 mL 0,5 M  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  (pH 8) mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf 1 L auffüllen

6 x Ladepuffer

- 0,25% Bromphenolblau
- 30% Glycerol

pUC 18

Proteinase K

- 10mg PK pro 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

SDS-Lösung

- 5% SDS in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

Agarosegel

- 1% Agarose in 1 x TAE-Puffer

Ethidiumbromid-Lösung

- 1  $\mu\text{g/mL}$  Ethidiumbromid in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ .

Topoisomerase I (4 units/ $\mu\text{L}$ )

## 7.13 Dekatenierungsassay

Die katalytische Aktivität der Topoisomerase II nach Inkubation mit den verschiedenen Testsubstanzen wird mit Hilfe des Dekatenierungsassays untersucht. Als Substrat dient hierbei kinetoplasten DNA, so genannte kDNA, welche aus ineinander verknoteten DNA-Zirkeln besteht und ein hochmolekulares Netzwerk darstellt. Auf Grund der Größe und Struktur kann kDNA während einer Agarosegelelektrophorese nicht ins Gel migrieren. Nur durch die katalytische Aktivität von Topoisomerase II, die einen transienten Doppelstrangbruch einführt und einen zweiten DNA-Strang hindurchführen kann, können aus der kDNA einzelne Minizirkel freigesetzt werden, welche in der Lage sind, ins Gel zu migrieren (Abb. 98). Es gibt zwei Isoformen der Topoisomerase II, den Typ II $\alpha$  mit einem Molekulargewicht von 170 kDa und den Typ II $\beta$  mit einem Molekulargewicht von 180 kDa.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgen die Anfärbung des Gels mit Ethidiumbromid und die abschließende Detektion im Lumi-Imager.

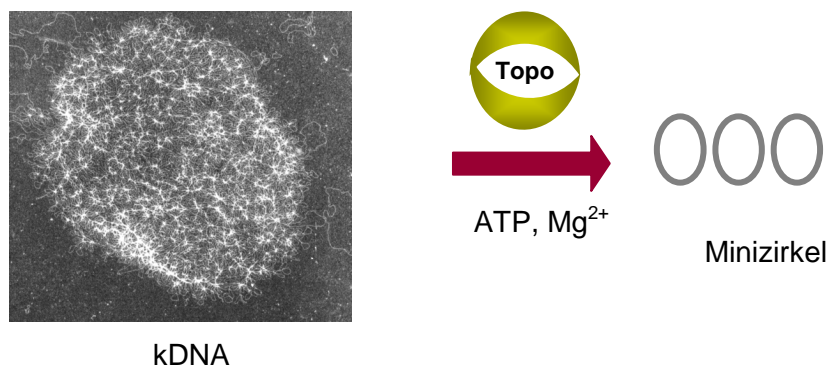


Abb.98: Dekatenierung der kDNA durch Topoisomerase II  
[modifiziert nach Esselen *et al.*, 2009]

**Durchführung:**

200 ng kDNA werden mit Topoisomerase II für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 3 µL Proteinase K gestoppt und zum wiederholten Mal für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach werden die Proben mit 5 µL Ladepuffer versetzt und 19 µL jeder Probe in die Geltasche des Agarosegels pipettiert (Tab. 21). Die Gelelektrophorese wird für 3 Stunden bei 60 V gestartet. Abschließend erfolgt die Anfärbung des Gels im Ethidiumbromid-Bad für ca. 10 min, das Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  für ca. 5 min und die Messung der Fluoreszenz bei 560 nm im Lumi-Imager.

Tab.21: Pipettierschema für Dekatenierungsassay

	Kontrolle	Substanz
H <sub>2</sub> O	19,4 µL	17,4 µL
Saltmix I	3 µL	3 µL
KCl	3,6 µL	3,6 µL
Tris-Puffer	3 µL	3 µL
kDNA	1 µL	1 µL
DMSO oder Substanzlsg.	-	1 µL
Topoisomerase II	-	1 µL

**Lösungen und Reagenzien für den Dekatenierungstest:**

Saltmix II

50 mM  $\text{MgCl}_2$   
5 mM DTT  
5 mM EDTA  
0,3 mg/mL BSA  
10 mM ATP

Tris/HCl

500 mM Tris (pH 7,9)

50x TAE-Puffer

242 g Tris Base  
57,1 mL Eisessig  
100 mL 0,5 M  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  (pH 8,0) mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  auf 1 L auffüllen

6x Ladepuffer

0,25% Bromphenolblau  
30% Glyzerol

Topo-Verdünnungslösung

50 mM Tris/ HCl (pH 7,5)  
400 mM NaCl  
1 mM DTT  
50% Glycerol

Proteinase K

1mg PK pro 1 mL 10% SDS

Agarosegel

1% Agarose in 1x TAE

Ethidiumbromid-Bad

1  $\mu\text{g/mL}$  Ethidiumbromid in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

## 7.14 ICE-Bioassay

Mit dem ICE-Bioassay können mit Hilfe eines Cäsiumchloridgradienten Enzym-DNA-Komplexe getrennt werden. Mittels spezifischer Antikörper gegen Topoisomerase I, II $\alpha$  und II $\beta$  erfolgt die Detektion und die Menge an Topoisomerasen, die kovalent an die DNA gebunden haben, kann bestimmt werden (Abb.99).

Durch dieses Testsystem kann weiter unterschieden werden, ob eine Testsubstanz als Topoisomerasegift oder als katalytischer Topoisomerasehemmstoff wirkt.

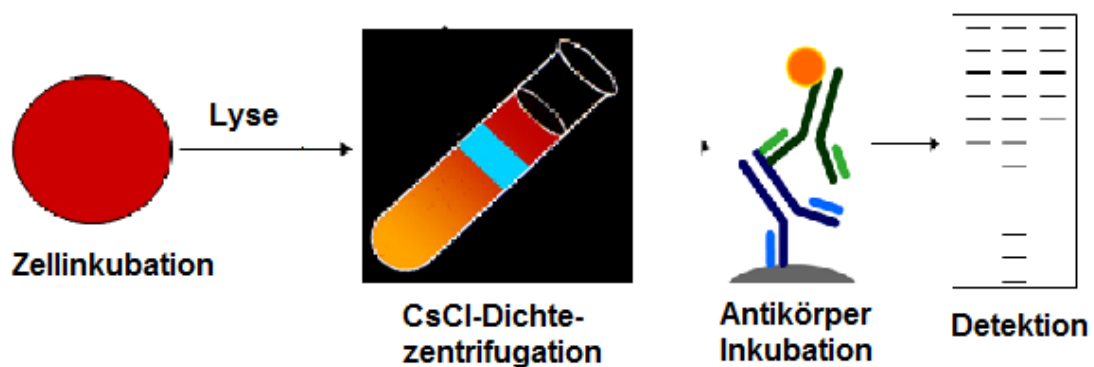


Abb.99: Schematische Darstellung des ICE-Bioassays  
[modifiziert nach Esselen *et al.*, 2009]

**Durchführung:*****Aussaat und Inkubation:***

Es werden 5 Mio. HT29 Zellen pro Petrischale (d = 20 cm) in 20 mL Kulturmedium ausgesät und für 72 Stunden bei 5% CO<sub>2</sub>, 37°C und 95% Luftfeuchte kultiviert. Die Substanzinkubation erfolgt mit serumfreien Medium für eine Stunde bzw. bei Kombinationsversuchen für 1,5 Stunden. Die Lösungsmittelkonzentration (DMSO) beträgt 0,5% im Endansatz.

***Zellyse, Vorbereitung des Cäsiumchloridgradienten und Ultrazentrifugation:***

Das Inkubationsmedium wird entfernt und die Zellen werden zweimal mit auf 37°C vorgewärmten PBS-Puffer gewaschen. Jede Platte wird mit 6 mL Lysepuffer behandelt, die Zellen werden abgeschabt und die Zellsuspension in 15 mL Gefäße überführt. Die Zellsuspension wird circa 20-mal durch eine dünne Kanüle resuspendiert, bis die Viskosität der Suspension nachlässt. Der Cäsiumchloridgradient wird vorbereitet, in dem 2 mL jeder Lösung von A bis D in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert wird. 4 mL der Zellsuspension werden anschließend auf den vorbereiteten Cäsiumchloridgradienten gegeben. Die Röhrchen werden zum Luftausschluss mit Mineralöl überschichtet und ausgewogen (auf 5-10 mg genau). Abschließend erfolgt eine Ultrazentrifugation mit dem Schwingrotor TST 41.14 für 22 h bei 100000 g und 20°C.

***Fraktionierung, Blotting und Blocken:***

Die Whatmanpapiere und die Nitrozellulosemembran werden über Nacht bei Raumtemperatur in 25 mM Phosphatpuffer äquilibriert. Die Fraktionierung der Proben erfolgt von der Unterseite der Polymer-Zentrifugenröhrchen. Mit Hilfe einer dünnen Kanüle werden 20 Fraktionen von ca. 350 µL entnommen. Von jeder Fraktion werden 300 µL mit 300 µL Phosphatpuffer versetzt, die Proben werden gemixt und je 200 µL werden mit Hilfe einer Slot-Blot Apparatur (Abb.100) und eines angelegten Vakuums auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membranen werden anschließend für 10 min in TBST äquilibriert, bevor sie für 3 Stunden bei Raumtemperatur mit Blockingreagenz behandelt werden.

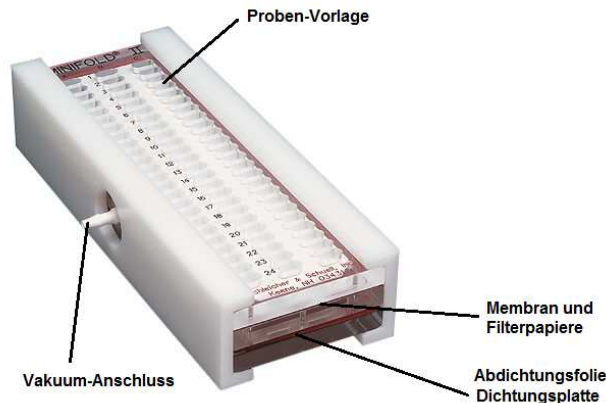


Abb.100: Aufbau einer Slot-Blot Apparatur  
[www.coleparmer.com]

### ***Antikörperinkubation und Detektion:***

Die Membran wird mit 5 mL Erstantikörperlösung in Folie eingeschweißt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Dann wird die Membran dreimal für 5 min mit 1x TBST gewaschen und es erfolgt die Zweitantikörperinkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Membran erneut dreimal für jeweils 5 min mit 1x TBST gewaschen. Durch Zugabe von  $H_2O_2$  und Luminol wird die Chemolumineszenzreaktion gestartet und die entstandene Chemolumineszenz mittels Lumi-Imager LAS3000 detektiert.

### ***Bestimmung des DNA-Gehalts:***

Der DNA-Gehalt wird mittels Nanodrop-Spektrometer ermittelt. Dies ist notwendig, um die Messwerte für die Topoisomerase auf den DNA-Gehalt der Probe zu normieren.



### **Lösungen und Reagenzien für den ICE-Bioassay:**

serumfreies Medium

DMEM ohne FKS mit 1% PS

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl (pH 8)

1 mM EDTA

Cäsiumchlorid-Lösung:

240 g CsCl , 140 mL TE-Puffer für den Gradienten:

- A: 1850  $\mu$ L CsCl + 150  $\mu$ L TE-Puffer
- B: 1600  $\mu$ L CsCl + 400  $\mu$ L TE-Puffer
- C: 1100  $\mu$ L CsCl + 900  $\mu$ L TE-Puffer
- D: 900  $\mu$ L CsCl + 1100  $\mu$ L TE-Puffer

10x TBST-Puffer (Lagerung bei 4°C):

200 mM Tris/HCl (pH 7,5),

1,37 M NaCl

1% Tween-20

Blockingreagenz

5% Milchpulver in 1x TBST-Puffer

oder 5% BSA in 1x TBST-Puffer

Lysepuffer

1% Sarcosylat in TE-Puffer

1 M Phosphatpuffer

1 M Stammlösung zweibasisches  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (pH 4)

1 M Stammlösung einbasisches  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (pH 9)

Stammlösungen 1: 1 mischen

25 mM Phosphatpuffer:

1 M Phosphatpuffer 1:40 verdünnen

Tab.21: Primärantikörper

Antikörper	Konzentration	Lösung	Dauer der Inkubation
<i>mouse-anti</i> -Topoisomerase I	1:1000	Milch + TBST	über Nacht
<i>rabbit-anti</i> -Topoisomerase II $\alpha$	1:400	BSA + TBST	über Nacht
<i>rabbit-anti</i> -Topoisomerase II $\beta$	1:333	Milch + TBST	über Nacht

Zweitantikörper: *Anti-rabbit*-HRP-IgG 1:2000 (für Topoisomerase II $\alpha$  und II $\beta$ ) in 5 mL Blockingreagenz/Membran, *Anti-mouse*-HRP-IgG (für Topoisomerase I) 1:2000 in 5 mL Blockingreagenz/Membran

## **Chemikalien, Geräte und Materialien:**

### **Reagenzien, Chemikalien, Enzyme:**

Acrylamid/Bis -Lösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	„ <i>low melting agarose</i> “ (LMA), Schmelzpunkt 37°C, BioRad, München, Deutschland  „ <i>normal melting agarose</i> “ (NMA), Schmelzpunkt 42°C, BioRad, München, Deutschland
Agarose	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampilicin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, München, Deutschland
BSA	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Caesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Camptothecin (CPT)	Sigma Aldrich, München, Deutschland

Chlorogensäure	Sigma Aldrich, München, Deutschland
DAPI	Applichem, Darmstadt, Deutschland
DMEM	PAA, Cölbe, Österreich Gibco, Auckland, Neuseeland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, München, Deutschland Merk, Darmstadt, Deutschland
1,4-Dithothretiol (DTT)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
EGTA	Sigma Aldrich, München, Deutschland
EGCG	Extrasynthese, Frankreich
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	entwässert, 99,8 vol.% Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	vergällt mit Petrolether Roth, Karlsruhe, Deutschland
Etoposid	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, München, Deutschland

FKS	Gold, PAA, Cölbe, Österreich
FKS-freies Medium (S-Medium)	500 mL DMEM, 1% PenStrep
Genistein	Extrasynthese, Frankreich
Glyzin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Glyzerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefe-Extrakt	Gibco, Auckland, Neuseeland
HEPES	Merck, Darmstadt, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland
IGEPAL	CA-630, Sigma Aldrich, München, Deutschland
Imersionsöl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Fulka, Deisendorf, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
kDNA	Topogen
Kits:	
HDAC-Aktivitätsassay-Kit	Cayman

Plasmid-Maxipräparationskit	Qiagen
Kupfersulfat	Fulka, Steinheim, Deutschland
Luminol-Reagenz	Santa Cruz Biotechnologies, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Menadion	Sigma Aldrich, München, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methyleugenol	Sigma Aldrich, München Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nährmedium (N-Medium)	500 mL DMEM, 10% FKS, 1% PenStrep
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumpyruvat	PAA, Cölbe, Österreich
N-Laurylsarcosin-Na-Salz	Merck, Darmstadt, Deutschland
PenStrep	Penicillin/ Streptomycin (1:1) Gibco, Auckland, Neuseeland
Protease-Inhibitorcocktail	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K	Sigma Aldrich, München, Deutschland
pUC18	Thermo Fisher Scientific
Roti-Mark, Bicolor, Proteinmarker	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sarcosylat	Sigma Aldrich, München, Deutschland
SeeBlue Plus 2	Invitrogen Life Technologies
Sucrose	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Sulforhodamin-B	Sigma Aldrich, München, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Topoisomerase I	Topogen
Topoisomerase II	Topogen

Trichloressigsäure (TCA)	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Tris	Sigma Aldrich, München, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Fulka, Steinheim, Deutschland
Trypsin	0,05% EDTA Gibco, Auckland, Neuseeland
Tween-20	Sigma Aldrich, München, Deutschland
1'-Hydroxymethyleugenol	wurden synthetisiert (Diplomarbeit) und die Reinheit mittels <sup>1</sup> H-NMR und HPLC bestimmt (≥ 97,5%)
Methyleugenol-2',3'-epoxid	
3'-Oxomethylisoeugenol	
3'-Hydroxymethylisoeugenol	synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Alexander Cartus

### Antikörper:

Topoisomerase I, IIα und IIβ	Santa Cruz Biotechnologie
SUMO E1	Santa Cruz Biotechnologie
HDAC Antibody Sampler Kit HDAC Isoformen 1-6	Cell Signaling
DNA damage Antibody Sampler Kit p-ATM; p-ATR; p-CHK1; p-CHK2; p-p53; p- BRCA1; γH2AX	Cell Signaling
α-Tubulin	Santa Cruz Biotechnologie



**Verbrauchsmaterialien:**

Bechergläser	Schott, Mainz, Deutschland
Deckgläser für Häemocytometer	24 x 24 mm, LOT 004711080, Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser	24 x 24 mm, Menzel GmbH, Kuchen, Deutschland
Duranflasche	Schott, Mainz, Deutschland
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz, Deutschland
Glaspipetten	5 mL Brand, Wertheim, Deutschland 10 mL Brand, Wertheim, Deutschland 20 mL Brand, Wertheim, Deutschland
Kanülen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Kulturflaschen	25 cm <sup>2</sup> Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland  75 cm <sup>2</sup> VWR, Darmstadt, Deutschland  175 cm <sup>2</sup> Nunc, Roskilde, Dänemark  175 cm <sup>2</sup> Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Messzylinder	VWR, Darmstadt, Deutschland
Mikrotiterplatten	24 well Greiner-Bio-One, Cellstar, Frickenhausen, Deutschland 96 well Sarstedt, Newton, NC 28658, USA
Multipettenaufsätze	Eppendorf, Bio Pur, Hamburg, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Roth, Karlsruhe, Deutschland VWR, Darmstadt, Deutschland
Objektträger	einseitig mattiert, 26 x 76 x 10 mm Menzel, Kuchen, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Petrischalen	Ø 60 mm Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland Ø 90 mm Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland Ø 150 mm Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	weiß Greiner Bio-One, Deutschland Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland gelb VWR Darmstadt, Deutschland Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland blau VWR Darmstadt, Deutschland Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße	1,5 mL Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland 2 mL Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Superfrost-Objektträger	Menzel, Kuchen, Deutschland

Tubes	15 mL VWR, Darmstadt, Deutschland Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland 50 mL VWR, Darmstadt, Deutschland Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Whatmanpapiere	Whatman Roth, Karlsruhe Deutschland
Zellschaber	BD Falcon Biosciences Bedford, MA, USA
Zentrifugenröhrchen	Beckmann

## Geräte:

Autoklav	Tuttmauer systec, 5075 EL, Wettenberg, Deutschland
Biofreezer	SanyoVIP series, Eetten Leur, Niederlande
Blotter- SemiPhor	Hoefer Scientific Instruments
Brenner	Gasprofi 1, W <sub>L</sub> D-TEC, Typ 0313209 Göttingen, Deutschland
Brutschrank	Binder GmbH, Typ 9040-0013 Tuttlingen, Deutschland
Elektrophoresekammer	Sub Cell, Bio Rad, München, Deutschland Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr Premium, Ochsenhausen, Deutschland
Kamera	Marlin, Allied Vision Technologies, Stadtroda, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr Premium, Ochsenhausen, Deutschland
Lumi-Imager	Roche, Boehringer Mannheim, Deutschland
Mikroskope	Lichtmikroskop: Zeiss Axiovert 25 Göttingen, Deutschland  Fluoreszenzmikroskop: Zeiss Axioskop 50/AC Heidelberg, Deutschland

Mikrowelle	Sharp, Deutschland
Minishaker	Bio Vortex V1, peqlab, Typ V-1+ Deutschland
	IKA Vortex, Genius 3, Laboratory Equipment, VG3, Deutschland
Multipette	Eppendorf Plus, Hamburg, Deutschland
Nanodrop	ThermoFisher Scientific (Peqlab)
Neubauer-Zählkammer	Neubauer Improved, Superior Marienfeld, Deutschland
pH-Meter	Calimetric, Knick
Pipetten	10 µL Eppendorf Research Hamburg, Deutschland 20 µL Eppendorf Research Hamburg, Deutschland 100 µL Eppendorf Research Hamburg, Deutschland 200 µL Eppendorf Research Hamburg, Deutschland 1000 µL Eppendorf Research Hamburg, Deutschland
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG Eberstadt, Deutschland
Plattenlesegerät	MWGt, Sirius HAT Injektor, Ebersberg, Deutschland

Pumpe	KNF Neuberger Laboport, Typ N86KT18 Freiburg, Deutschland
Schüttler	Kottermann, Deutschland
Slot-Blot-Apparatur	Minifold II System, Whatman
Software	Comet IV Perceptive Instruments, Suffolk, England  Geno5, Bio Tek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland  Analyst 3.1 Software, Boehringer, Deutschland  Nanodrop 2000 Software
Sterilbank	Biowizard, KojairTyp KR-130BW Vilppula, Finnland
Thermoshaker	TS 100, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, L-100XP Rotor SW 40 Ti S/N
Waagen	Sartorius, CP 64-OCE, Göttingen Deutschland

Wasserbad	Julabo Modell EC, Seelbach, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland 5804R Eppendorf, Hamburg, Detuschland

## Literaturverzeichnis

**Abdo KM**, Cunningham ML, Snell ML, Herbert RA, Travlos GS, Eldridge SR, Bucher JR, "14-Week toxicity and cell proliferation of methyleugenol administered by gavage to F344 rats and B6C3F1 mice", *Food Chem. Toxicol*, **2001**, 39, 303-316

**Abel T**, Zukin RS, "Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders", *Curr Opin Pharmacol*, **2008**, 8(1): 57-64

**Adcock IM**, Br J, "HDAC inhibitors as anti-inflammatory agents", *Pharmacol*, **2007**, 150(7): 829-831

**Adcock IM**, Tsaprouni L, Bhavsar P, Ito K, "Epigenetic regulation of airway inflammation", *Curr Opin Immunol*, **2007**, 19(6): 694-700

**Ahn JY**, Li X, Davis HL, Canman CE., "Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain", *J Biol Chem*, **2002**, 277(22), 19389-19395

**Alberts B**, Jaenicke L, "Molekularbiologie der Zelle", *Wiley- VHC*, Weinheim, **2004**, 4. Auflage

**Albrecht S**, Brandl H, Adam W, "Chemilumineszenz-Reaktionen", *Chemie in unserer Zeit*, **1990**, 5, 227-238

**Alhusainy W**, Paini A, Punt A, Louisse J, Spenkelink A, Vervoort J, Delatour T, Scholz G, Schilter B, Adams T, van Bladeren PJ, Rietjens IM, "Identification of nevadensin as an important herb-based constituent inhibiting estragole bioactivation and physiology-based biokinetic modeling of its possible in vivo effect", *Toxicol Appl Pharmacol*, **2010**, 245(2): 179-190

**Al-Subeihi AA**, Spenkelink B, Rachmawati N, Boersma MG, Punt A, Vervoort J, van Bladeren PJ, Rietjens I, "Physiologically based biokinetic model of bioactivation and detoxification of alkenylbenzene methyleugenol in rat", *Toxicology in vitro*, **2011**, 25: 267-285

**Al-Subeihi AA**, Spenkelink B, Punt A, Boersma MG, van Bladeren PJ, Rietjens IM, "Physiologically based kinetic modeling of bioactivation and detoxification of the alkenylbenzene methyleugenol in human as compared with rat", *Toxicol Appl Pharmacol*, **2012**, 260(3): 271-284

**Al-Subeihi AA**, Alhusainy W, Paini A, Punt A, Vervoort J, van Bladeren PJ, Rietjens IM, "Inhibition of methyleugenol bioactivation by the herb-based constituent nevadensin and prediction of possible in vivo consequences using physiologically based kinetic modeling", *Food Chem Toxicol*, **2013**, 59: 564-571

**Amin A**, Gali-Muhtasib H, Ocker M, Schneider-Stock R, "Overview of Major Classes of Plant-derived anticancer drugs", *Int J Biomed Sci*, 5 (1), **2009**, 1-11



- Arif M**, Kumar GV, Narayana C, Kundu TK, "Autoacetylation induced specific structural changes in histone acetyltransferase domain of p300: probed by surface enhanced Raman spectroscopy", *J Phys Chem B*, **2007**, 111(41): 11877-11879
- Arnold CN**, Sosnowski A, Schmitt-Gräff A, Arnold R, Blum HE, "Analysis of molecular pathways in sporadic neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system", *Int J Cancer*, **2007**, 120(10): 2157-2164
- Arts IC**, Hollman PC, Bueno De Mesquita HB, Feskens EJ, Kromhout D, "Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen elderly study", *Int J Cancer*, **2001**, 92(2): 298-302
- Arts IC**, Hollman PC, Feskens EJ, Bueno de Mesquita HB, Kromhout D, "Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study", *Am J Clin Nutr*, **2001**, 74(2): 227-232
- Atmaca A**, Al-Batran SE, Maurer A, Neumann A, Heinzel T, Hentsch B, Schwarz SE, Hövelmann S, Göttlicher M, Knuth A, Jäger E, "Valproic acid (VPA) in patients with refractory advanced cancer: a dose escalating phase I clinical trial", *Br J Cancer*, **2007**, 97(2): 177-182
- Austin CA, Marsh KL**, "Eukaryotic DNA topoisomerase II beta", *Bioessays*, **1998**, 20(3): 215-226
- Azqueta A, Collins AR**, "The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair", *Arch Toxicol*, **2013**, 87(6): 949-968
- Baechler SA**, Schroeter A, Dicker M, Steinberg P, Marko D, "Topoisomerase II-Targeting Properties of a Grapevine-Shoot Extract and Resveratrol Oligomers", *J Agric Food Chem*, **2014**
- Baechler SA**, Schroeter A, Walker J, Aichinger G, Marko D, "Oxidative metabolism enhances the cytotoxic and genotoxic properties of the soy isoflavone daidzein", *Mol Nutr Food Res*, **2014**
- Bailly C**, "Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs", *Curr Med Chem*, **2000**, 7(1): 39-58
- Baldwin EL, Osheroff N**, "Etoposide, topoisomerase II and cancer", *Curr Med Chem Anticancer Agents*, **2005**, 5(4): 363-372
- Bali P**, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, Rocha K, Kumaraswamy S, Boyapalle S, Atadja P, Seto E, Bhalla K, "Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors", *J Biol Chem*, **2005**, 280(29): 26729-26734
- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S**, Janssen J, Maas LM, Godschalk RW, Nijhuis JG, van Schooten FJ, "Dietary flavonoids induce MLL translocations in primary human CD34+ cells", *Carcinogenesis*, **2007**, 28(8): 1703-1709

**Barth SW**, Fährndrich C, Bub A, Dietrich H, Watzl B, Will F, Briviba K, Rechkemmer G, "Cloudy apple juice decreases DNA damage, hyperproliferation and aberrant crypt foci development in the distal colon of DMH-initiated rats", *Carcinogenesis*, **2005**, 26(8): 1414-1421

**Barth SW**, Briviba K, Watzl B, Jäger N, Marko D, Esselen M, "In vivo bioassay to detect irinotecan-stabilized DNA/topoisomerase I complexes in rats", *Biotechnol J*, **2010**, 5(3): 321-327

**Bassing CH**, Chua KF, Sekiguchi J, Suh H, Whitlow SR, Fleming JC, Monroe BC, Ciccone DN, Yan C, Vlasakova K, Livingston DM, Ferguson DO, Scully R, Alt FW, "Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2002**, 99(12): 8173-8178

**Bekker-Jensen S**, Lukas C, Kitagawa R, Melander F, Kastan MB, Bartek J, Lukas J, "Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks", *J Cell Biol*, **2006**, 173(2): 195-206

**Belitz HD**, Grosch W, Schieberle P, "Lehrbuch der Lebensmittelchemie", 6.Auflage, Springer-Verlag GmbH, **2008**

**Bellion P**, Hofmann T, Pool-Zobel BL, Will F, Dietrich H, Knaup B, Richling E, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C, "Antioxidant effectiveness of phenolic apple juice extracts and their gut fermentation products in the human colon carcinoma cell line caco-2", *J Agric Food Chem*, **2008**, 56(15): 6310-6317

**Bellion P**, Olk M, Will F, Dietrich H, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C, "Formation of hydrogen peroxide in cell culture media by apple polyphenols and its effect on antioxidant biomarkers in the colon cell line HT-29", *Mol Nutr Food Res*, **2009**, 53(10): 1226-1236

**Bender RP**, Lehmler HJ, Robertson LW, Ludewig G, Osheroff N, "Polychlorinated biphenyl quinone metabolites poison human topoisomerase IIalpha: altering enzyme function by blocking the N-terminal protein gate", *Biochemistry*, **2006**, 45(33): 10140-10152

**Bender RP**, Ham AJ, Osheroff N, "Quinone-induced enhancement of DNA cleavage by human topoisomerase IIalpha: adduction of cysteine residues 392 and 405", *Biochemistry*, **2007**, 46(10): 2856-2864

**Bender RP**, Jablonksy MJ, Shadid M, Romaine I, Dunlap N, Anklin C, Graves DE, Osheroff N, "Substituents on etoposide that interact with human topoisomerase IIalpha in the binary enzyme-drug complex: contributions to etoposide binding and activity" *Biochemistry*, **2008**, 47(15): 4501-4509

**Bender RP**, Osheroff N, "Mutation of cysteine residue 455 to alanine in human topoisomerase IIalpha confers hypersensitivity to quinones: enhancing DNA scission by closing the N-terminal protein gate", *Chem Res Toxicol*, **2007**, 20(6): 975-981

**Berg JM**, Tymoczko JL, Stryer L, "Biochemistry", *Freeman and Company*, **2007**, New York, 6. Auflage

**Berger JM**, "Structure of DNA topoisomerases", *Biochem Biophys Acta*, **1998**, 1400, 3-18

www.bfr.bund.de

**BgVV**, "Gesundheitliche Bewertung von Duftölen, die Safrol, Methyleugenol oder Estragol enthalten", *Stellungnahme* vom **11.05.2001**

**Bg VV**, "Estragol- und Methyleugenolgehalte in Lebensmitteln verringern", *Pressemittteilung* vom **24.06.2002**

**BgVV**, "Minimierung von Estragol- Methyleugenol- Gehalten In Lebensmitteln", *Hintergrundpapier* vom **15.01.2002**

**Bhalla KN**, "Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies", *J Clin Oncol*, **2005**, 23(17): 3971-3993

**Biel M**, Wascholowski V, Giannis A, "Epigenetics-an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes", *Angew Chem Int Ed Engl*, **2005**, 44(21): 3186-3216

**Bilecová-Rabajdová M**, Birková A, Urban P, Gregová K, Durovcová E, Mareková M, "Naturally occurring substances and their role in chemo-protective effects", *Cent Eur J Public Health*, **2013**, 21(4): 213-219

**Blackwood E**, Epler J, Yen I, Flagella M, O'Brien T, Evangelista M, Schmidt S, Xiao Y, Choi J, Kowanetz K, Ramiscal J, Wong K, Jakubiak D, Yee S, Cain G, Gazzard L, Williams K, Halladay J, Jackson PK, Malek S, "Combination drug scheduling defines a "window of opportunity" for chemopotential of gemcitabine by an orally bioavailable, selective ChK1 inhibitor, GNE-900", *Mol Cancer Ther*, **2013**, 12(10): 1968-1980

**Bodó A**, Bakos E, Szeri F, Váradi A, Sarkadi B, "The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity", *Toxicol Lett*, **2003**, 140-141: 133-143

**Boege F**, "Analysis of eukaryotic DNA topoisomerases and topoisomerase-directed drug effects", *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, **1996**, 34(11): 873-888

**Boettler U**, Sommerfeld K, Volz N, Pahlke G, Teller N, Somoza V, Lang R, Hofmann T, Marko D, "Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression", *J Nutr Biochem*, **2011**, 22(5): 426-440

**Bonelli P**, Tuccillo FM, Borrelli A, Schiattarella A, Buonaguro FM, "CDK/CCN and CDKI alterations for cancer prognosis and therapeutic predictivity", *Biomed Res Int*, **2014**, 2014, 361020

- Bonner WM**, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y, "GammaH2AX and cancer", *Nat Rev Cancer*, **2008**, 8(12): 957-967
- Bonney RJ**, "Adult liver parenchymal cells in primary culture characteristics and cell recognition standards", *In Vitro*, **1974**, 10: 130-142
- Bora-Tatar G**, Dayangaç-Erden D, Demir AS, Dalkara S, Yelekçi K, Erdem-Yurter H, "Molecular modifications on carboxylic acid derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: Activity and docking studies", *Bioorg Med Chem*, **2009**, 17(14): 5219-5228
- Borschert P**, Miller JA, Miller EC, Shires TK, "1'- Hydroxysafrole, a Proximate Carcinogenic Metabolite of Safrole in the Rat and Mouse", *Cancer Research*, **1973**, 33, 590-600
- Borschert P**, Wislocki PG, Miller JA, Miller EC, "The Metabolism of Naturally Occurring Hepatocarcinogen Safrole to 1'Hydroxysafrole and the Electrophilic Reactivity of 1'- Acetoxysafrole", *Cancer Research*, **1973**, 33, 575-589
- Bourgine J**, Billaut-Laden I, Happillon M, Lo-Guidice JM, Maunoury V, Imbenotte M, Broly F, "Gene expression profiling of systems involved in the metabolism and the disposition of xenobiotics: comparison between human intestinal biopsy samples and colon cell lines", *Drug Metab Dispos*, **2012**, 40(4): 694-705
- Bradford MM**, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal Biochem*, **1976**, 72, 284-354
- Brandl A**, Wagner T, Uhlig KM, Knauer SK, Stauber RH, Melchior F, Schneider G, Heinzl T, Krämer OH, "Dynamically regulated sumoylation of HDAC2 controls p53 deacetylation and restricts apoptosis following genotoxic stress", *J Mol Cell Biol*, **2012**, 4(5): 284-293
- Brennan RJ**, Kandikonda S, Khrimian AP, DeMilo AB, Liquido NJ, Schiestl RH, "Saturated and monofluoro analogs of the oriental fruit fly attractant methyl eugenol show reduced genotoxic activities in yeast", *Mutat Res*, **1996**, 369(3-4): 175-181
- Brown EJ, Baltimore D**, "Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance", *Genes Dev*, **2003**, 17(5): 615-628
- Buggy JJ**, Sideris ML, Mak P, Lorimer DD, McIntosh B, Clark JM, "Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8", *Biochem J*, **2000**, 350 Pt 1: 199-205
- Burden DA**, Kingma PS, Froelich-Ammon SJ, Bjornsti MA, Patchan MW, Thompson RB, Osheroff N, "Topoisomerase II. etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes", *J Biol Chem*, **1996**, 271(46): 29238-29244
- Burden DA, Osheroff N**, "Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme", *Biochim Biophys Acta*, **1998**, 1400(1-3): 139-154

**Burkey JL**, Sauer JM, McQueen CA, Sipes IG, "Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners- a mechanism of activation for methyleugenol", *Mutat. Res*, **2000**, 453, 1, 25-33

**Burma S**, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ, "ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks", *J Biol Chem*, **2001**, 276(45): 42462-42467

**Callebaut I, Mornon JP**, "From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair", *FEBS Lett*, **1997**, 400(1): 25-30

**Carey JF**, Schultz SJ, Sisson L, Fazzio TG, Champoux JJ, "DNA relaxation by human topoisomerase I occurs in the closed clamp conformation of the protein", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**, 100(10): 5640-5645

**Cartus AT**, Herrmann K, Weishaupt LW, Merz KH, Engst W, Glatt H, Schrenk D, "Metabolism of methyleugenol in liver microsomes and primary hepatocytes: pattern of metabolites, cytotoxicity, and DNA-adduct formation", *Toxicol Sci*, **2012**, 129(1): 21-34

**Cartus AT**, "Identifizierung und Quantifizierung mikrosomaler Metaboliten von Eugenol, Isoeugenol, Methyleugenol und Methyloisoeugenol", *Diplomarbeit, TU Kaiserslautern*, **2009**

**Castelli S**, Campagna A, Vassallo O, Tesauo C, Fiorani P, Tagliatesta P, Oteri F, Falconi M, Majumder HK, Desideri A, "Conjugated eicosapentaenoic acid inhibits human topoisomerase IB with a mechanism different from camptothecin", *Arch Biochem Biophys*, **2009**, 486(2): 103-110

**Castelli S**, Coletta A, D'Annessa I, Fiorani P, Tesauo C, Desideri A, "Interaction between natural compounds and human topoisomerase I", *Biol Chem*, **2012**, 393(11): 1327-1340

**Celeste A**, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Olaru A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A, "Genomic instability in mice lacking histone H2AX", *Science*, **2002**, 296(5569): 922-927

**Celeste A**, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A, "Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks", *Nat Cell Biol*, **2003**, 5(7): 675-679

**Celeste A**, Difilippantonio S, Difilippantonio MJ, Fernandez-Capetillo O, Pilch DR, Sedelnikova OA, Eckhaus M, Ried T, Bonner WM, Nussenzweig A, "H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility", *Cell*, **2003**, 114(3): 371-383

**Champoux JJ**, "DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism", *Annu Rev Biochem*, **2001**, 70: 369-413

**Chavez-Blanco A**, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Cetina L, Candelaria M, Cantu D, Gonzalez-Fierro A, Garcia-Lopez P, Zambrano P, Perez-Plasencia C, Cabrera G, Trejo-Becerril C, Angeles E, Duenas-Gonzalez A, "Histone acetylation and histone deacetylase activity of magnesium valproate in tumor and peripheral blood of patients with cervical cancer. A phase I study", *Mol Cancer*, **2005**, 4(1): 22

**Chen H**, Tini M, Evans RM, "HATs on and beyond chromatin", *Curr Opin Cell Biol*, **2001**, 13(2): 218-24

**Chen D**, Milacic V, Chen MS, Wan SB, Lam WH, Huo C, Landis-Piowar KR, Cui QC, Wali A, Chan TH, Dou QP, "Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets", *Histol Histopathol*, **2008**, 23(4), 487-496

**Chen D, Dou QP**, "Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy", *Int J Mol Sci*, **2008**, 9(7): 1196-1206

**Chiocca S**, Seiser C, "Lifting the threshold between life and death: SUMO and HDAC fine-tune HIPK2 to sense redox status", *Mol Cell*, **2012**, 38, 46(4): 382-383

**Chung YL**, Lee MY, Pui NN, "Epigenetic therapy using the histone deacetylase inhibitor for increasing therapeutic gain in oral cancer: prevention of radiation-induced oral mucositis and inhibition of chemical-induced oral carcinogenesis", *Carcinogenesis*, **2009**, 30(8): 1387-1397

**Clifford MN**, "Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism", *J Sci Food Agri*, **2000**, 80 (7), 1033-1043

**Collins AR**, Duthie SJ, Dobson VL, "Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA", *Carcinogenesis*, **1993**, 14(9): 1733-1735

**Collins A**, "The Comet Assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations", *Mol. Biotechnol*, **2004**, 26, 249-261

**Collins AR**, "Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay", *Biochim Biophys Acta*, **2014**, 1840(2)

**Colombo R**, Boggio R, Seiser C, Draetta GF, Chiocca S, "The adenovirus protein Gam1 interferes with sumoylation of histone deacetylase 1", *EMBO Rep*, **2002**, 3(11): 1062-1068

**Cooke D**, Schwarz M, Boocock D, Winterhalter P, Steward WP, Gescher AJ, Marczylo TH, "Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the ApcMin mouse model of intestinal carcinogenesis-relationship with tissue anthocyanin levels", *Int J Cancer*, **2006**, 119(9): 2213-2220

**Corbett KD, Berger JM**, "Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases", *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **2004**, 33: 95-118

- Corbett AH, Osheroff N**, "When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs", *Chem Res Toxicol*, **1993**, 6(5): 585-597
- Chan VS, Caldwell J**, "Comparative induction of unscheduled DNA synthesis in cultured rat hepatocytes by allylbenzene and their 1'-hydroxyl metabolites", *Food Chem. Toxicol*, **1992**, 30, 10, 831-836
- Cutts SM**, Nudelman A, Rephaeli A, Phillips DR, "The power and potential of doxorubicin-DNA adducts", *IUBMB Life*, **2005**, 57(2): 73-81
- Peter Daniel**, "Zellzyklus und Apoptose Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien", *Molekulare Medizin*, **2003**, 130-184
- David G**, Neptune MA, DePinho RA, "SUMO-1 modification of histone deacetylase 1 (HDAC1) modulates its biological activities", *J Biol Chem*, **2002**, 277(26): 23658-23663
- de Ruijter AJ**, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB, "Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family", *Biochem J*, **2003**, 370(Pt 3): 737-749
- de Waziers I**, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP, Beaune PH, "Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues", *J Pharmacol Exp Ther*, **1990**, 253(1): 387-394
- Deb G**, Thakur VS, Limaye AM, Gupta S, "Epigenetic induction of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 by green tea polyphenols in breast cancer cells", *Mol Carcinog*, **2014**
- Decker M**, Arand M, Cronin A, "Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling", *Arch Toxicol*, **2009**, 83(4): 297-318
- Décordé K**, Teissèdre PL, Auger C, Cristol JP, Rouanet JM, "Phenolics from purple grape, apple, purple grape juice and apple juice prevent early atherosclerosis induced by an atherogenic diet in hamsters", *Mol Nutr Food Res*, **2008**, 52(4): 400-407
- Degen GH**, Janning P, Wittsiepe J, Upmeyer A, Bolt HM, "Integration of mechanistic data in the toxicological evaluation of endocrine modulators", *Toxicol Lett*, **2002**, 127(1-3): 225-237
- Deweese JE**, Burch AM, Burgin AB, Osheroff N. Use of divalent metal ions in the dna cleavage reaction of human type II topoisomerases", *Biochemistry*, **2009**, 48(9), 1862-1869
- Deweese JE, Osheroff N**, "Coordinating the two protomer active sites of human topoisomerase II $\alpha$ : nicks as topoisomerase II poisons", *Biochemistry*, **2009**, 48(7): 1439-1441

- Deweese JE, Osheroff N**, "The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing", *Nucleic Acids Res*, **2009**, 37(3): 738-748
- Deweese JE, Osheroff N**, "The use of divalent metal ions by type II topoisomerases", *Metallomics*, **2010**, 2(7): 450-459
- Dickey JS**, Redon CE, Nakamura AJ, Baird BJ, Sedelnikova OA, Bonner WM, "H2AX: functional roles and potential applications", *Chromosoma*, **2009**, 118(6): 683-692
- Dickey JS**, Baird BJ, Redon CE, Sokolov MV, Sedelnikova OA, Bonner WM, "Intercellular communication of cellular stress monitored by gamma-H2AX induction", *Carcinogenesis*, **2009**, 30(10): 1686-1695
- Dickson C**, "Protein techniques: immunoprecipitation, in vitro kinase assays, and Western blotting", *Methods Mol. Biol*, **2008**, 461: 735-744
- Ding W**, Levy DD, Bishop ME, Lyn-Cook Lascelles E, Kulkarni R, Chang CW, Aidoo A, Manjanatha MG, "Methyleugenol genotoxicity in the Fischer 344 rat using the comet assay and pathway-focused gene expression profiling", *Toxicol Sci*, **2011**, 123(1): 103-112
- DiTullio RA Jr**, Mochan TA, Venere M, Bartkova J, Sehested M, Bartek J, Halazonetis TD, "53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer", *Nat Cell Biol*, **2002**, 4(12): 998-1002
- Doehmer J**, "The use and value of in vitro technologies in metabolism studies", *Altern Lab Anim*, **2009**, 37 Suppl 1: 29-32
- Dokmanovic M**, Clarke C, Marks PA, "Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives", *Mol Cancer Res*, **2007**, 5(10): 981-989
- Dokmanovic M, Marks PA**, "Prospects: histone deacetylase inhibitors", *J Cell Biochem*, **2005**, 96(2): 293-304
- Dorange JL**, Delaforge M, Janiaud P, Padieu P, "Mutagenicity of the metabolites of the epoxide-diol pathway of safrole and its analogs. Study on Salmonella typhimurium C", *R Seances Soc Biol Fil*, **1977**, 171(5): 1041-1048
- D'Orazi G**, Cecchinelli B, Bruno T, Manni I, Higashimoto Y, Saito S, Gostissa M, Coen S, Marchetti A, Del Sal G, Piaggio G, Fanciulli M, Appella E, Soddu S, "Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis", *Nat Cell Biol*, **2002**, 4(1): 11-19
- Drummond EM**, Harbourne N, Marete E, Jacquier JC, O'Riordan D, Gibney ER, "An in vivo study examining the antiinflammatory effects of chamomile, meadowsweet, and willow bark in a novel functional beverage", *J Diet Suppl*, **2013**, 10(4): 370-380



**Ducasse M**, Brown MA, "Epigenetic aberrations and cancer", *Mol Cancer*, **2006**, 5, 60, 1-19

**Duthie GG**, Duthie SJ, Kyle JA, "Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants", *Nutr Res Rev*, **2000**, 13(1): 79-106

**Dynan WS**, **Yoo S**, "Interaction of Ku protein and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit with nucleic acids", *Nucleic Acids Res*, **1998**, 26(7): 1551-1559  
www.efsa.europa.de; Bewertung des Risikos gentoxischer und kanzerogener Verunreinigungen: der MOE Ansatz

**Eisenbrand G**, Metzler M, Hennecke FJ, "Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner", *Wiley VCH, Weinheim*, **2005**

**Eisenbrand G**, Schreier P, "Römpf Lexikon Lebensmittelchemie", *Thieme Verlag Stuttgart New York*, 2.Auflage, **2006**

**Eisenbrand G**, Metzler M, "Toxikologie für Chemiker – Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren", *Thieme Verlag Stuttgart, New York*, **1994**

**Eng WK**, Faucette L, Johnson RK, Sternglanz R, "Evidence that DNA topoisomerase I is necessary for the cytotoxic effects of camptothecin", *Mol Pharmacol*, **1988**, 34(6): 755-760

**Eot-Houllier G**, Fulcrand G, Magnaghi-Jaulin L, Jaulin C, "Histone deacetylase inhibitors and genomic instability", *Cancer Lett*, **2009**, 274(2): 169-176

**Errington F**, Willmore E, Leontiou C, Tilby MJ, Austin CA, "Differences in the longevity of topo IIalpha and topo IIbeta drug-stabilized cleavable complexes and the relationship to drug sensitivity", *Cancer Chemother Pharmacol*, **2004**, 53(2): 155-162

**Esselen M**, Fritz J, Hutter M, Marko D, "Delphinidin modulates the DNA-damaging properties of topoisomerase II poisons", *Chem Res Toxicol*, **2009**, 22(3), 554-564

**Fabbro M**, Schuechener S, Au WW, Henderson BR, "BARD1 regulates BRCA1 apoptotic function by a mechanism involving nuclear retention", *Exp Cell Res*, **2004**, 298(2): 661-673

**Falbe J**, und M. **Regitz** (HRSG.), "Römpf. Basislexikon. Chemie", *Thieme Verlag Stuttgart, New York*, **1999**

**Falck J**, Lukas C, Protopopova M, Lukas J, Selivanova G, Bartek J, "Functional impact of concomitant versus alternative defects in the Chk2-p53 tumour suppressor pathway", *Oncogene*, **2001**, 20(39): 5503-5510

**Fang MZ**, Jin Z, Wang Y, Liao J, Yang GY, Wang LD, Yang CS, "Promoter hypermethylation and inactivation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in esophageal squamous cell carcinomas and its reactivation in cell lines", *Int J Oncol*, **2005**, 26(3): 615-622

- Farah A**, Monteiro M, Donangelo CM, Lafay S, "Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans", *J Nutr*, **2008**, 138(12): 2309-2315
- Fenaroli**, "Fenaroli's Handbook of flavour ingredients", *CRC Press, Cleveland, Ohio*, **1975**, Band 1 und Band 2
- Fernandez-Capetillo O**, Chen HT, Celeste A, Ward I, Romanienko PJ, Morales JC, Naka K, Xia Z, Camerini-Otero RD, Motoyama N, Carpenter PB, Bonner WM, Chen J, Nussenzweig A, "DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1", *Nat Cell Biol*, **2002**, 4(12): 993-997
- Feskanich D**, Ziegler RG, Michaud DS, Giovannucci EL, Speizer FE, Willett WC, Colditz GA, "Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women", *J Natl Cancer Inst*, **2000**, 92(22): 1812-1823
- Finnin MS**, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP, "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors", *Nature*, **1999**, 401(6749): 188-193
- Fogal V**, Gostissa M, Sandy P, Zacchi P, Sternsdorf T, Jensen K, Pandolfi PP, Will H, Schneider C, Del Sal G, "Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform", *EMBO J*, **2000**, 19(22): 6185-6195
- Fogh**, "Human Tumor Cells in vitro", **1975**, *Plenum Press*, New York
- Fojo T**, Bates S, "Strategies for reversing drug resistance", *Oncogene*, **2003**, 22(47): 7512-7523
- Foray N**, Marot D, Gabriel A, Randrianarison V, Carr AM, Perricaudet M, Ashworth A, Jeggo P, "A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein", *EMBO J*, **2003**, 22(11): 2860-2871
- Forster U**, Luippold G, Schwarz LR, "Induction of monooxygenase and UDP-glucuronosyltransferase activities in primary cultures of rat hepatocytes", *Drug Metab Dispos*, **1986**, 14(3): 353-360
- Fortune JM**, Osheroff, "Merbarone inhibits the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by blocking DNA cleavage", *J Biol Chem*, **1998**, 273(28): 17643-17650
- Frey RR**, Wada CK, Garland RB, Curtin ML, Michaelides MR, Li J, Pease LJ, Glaser KB, Marcotte PA, Bouska JJ, Murphy SS, Davidsen SK, "Trifluoromethyl ketones as inhibitors of histone deacetylase", *Bioorg Med Chem Lett*, **2002**, 12(23): 3443-3447
- Froelich-Ammon SJ**, Osheroff N, "Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism", *J Biol Chem*, **1995**, 270(37): 21429-21432
- Fuentes E**, Caballero J, Alarcón M, Rojas A, Palomo I, "Chlorogenic acid inhibits human platelet activation and thrombus formation", *PLoS One*, **2014**, 9(3), 90699

- Furuta T**, Takemura H, Liao ZY, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, Pilch DR, Rogakou EP, Celeste A, Chen HT, Nussenzweig A, Aladjem MI, Bonner WM, Pommier Y, "Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes", *J Biol Chem*, **2003**, 278(22): 20303-20312
- Gallinari P**, Di Marco S, Jones P, Pallaoro M, Steinkühler C, "HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics", *Cell Res*, **2007**, 17(3): 195-211
- Gao L**, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P, "Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family", *J Biol Chem*, **2002**, 277(28): 25748-25755
- Gao J**, Xu P, Wang Y, Wang Y, Hochstetter D, "Combined effects of green tea extracts, green tea polyphenols or epigallocatechin gallate with acarbose on inhibition against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase in vitro", *Molecules*, **2013**, 18(9): 11614-11623
- Gardner I**, Bergin P, Stening P, Kenna JG, Caldwell J, "Immunochemical Detection of Covalently Modified Protein Adducts in Livers of Rats Treated with Methyleugenol", *Chem. Res. Toxicol*, **1996**, 9: 713-721
- Gardner I**, Wakazono H, Bergin P, de Waziers I, Beaune P, Kenna JG, Caldwell J, "Cytochrome P450 mediated bioactivation of methyleugenol to 1'-hydroxymethyleugenol in Fischer 344 rat and human liver microsomes", *Carcinogenesis*, **1997**, 18, 1775-1783
- Gardner CD**, Chatterjee LM, Franke AA, "Effects of isoflavone supplements vs. soy foods on blood concentrations of genistein and daidzein in adults", *J Nutr Biochem*, **2009**, 20(3): 227-234
- Gatei M**, Shkedy D, Khanna KK, Uziel T, Shiloh Y, Pandita TK, Lavin MF, Rotman G, "Ataxia-telangiectasia: chronic activation of damage-responsive functions is reduced by alpha-lipoic acid", *Oncogene*, **2001**, 20(3):289-294
- Gatto MT**, Falcocchio S, Grippa E, Mazzanti G, Battinelli L, Nicolosi G, Lambusta D, Saso L, "Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters", *Bioorg Med Chem*, **2002**, 10(2): 269-272
- Geoffroy MC**, Hay RT, "An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis", *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2009**, 10(8): 564-568
- Geoffroy MC**, Hay RT, "An additional role for SUMO in ubiquitin-mediated proteolysis", *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2009**, 10(8): 564-568
- Gey M**, "Instrumentelle Bioanalytik", Vieweg, Braunschweig, **1998**
- Gilroy KL**, Austin CA, "The impact of the C-terminal domain on the interaction of human DNA topoisomerase II  $\alpha$  and  $\beta$  with DNA", *PLoS One*, **2011**, 6(2), 14693

**Glatt H**, Gemperlein I, Setiabudi F, Platt KL, Oesch F, "Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds", *Mutagenesis*, **1990**, 5(3): 241-249

**Glatt H**, "HPRT-Genmutationstest in V79 Zellen des chinesischen Hamsters", *Fahrig, Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, **1993**, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, S. 243-262

**Glozak MA**, Sengupta N, Zhang X, Seto E, "Acetylation and deacetylation of non-histone proteins", *Gene*, **2005**, 363: 15-23

**Glozak MA**, Seto E, "Histone deacetylases and cancer", *Oncogene*, **2007**, 26(37): 5420-5432

**Goldberg Z**, Vogt Sionov R, Berger M, Zwang Y, Perets R, Van Etten RA, Oren M, Taya Y, Haupt Y, "Tyrosine phosphorylation of Mdm2 by c-Abl: implications for p53 regulation", *EMBO J*, **2002**, 21(14): 3715-3727

**Goldberg M**, Stucki M, Falck J, D'Amours D, Rahman D, Pappin D, Bartek J, Jackson SP, "MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint", *Nature*, **2003**, 421(6926): 952-956

**Gordaliza M**, Castro MA, del Corral JM, Feliciano AS, "Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds", *Curr Pharm Des*, **2000**, 6(18): 1811-1839

**Gottesman MM**, Fojo T, Bates SE, "Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters", *Nat Rev Cancer*, **2002**, 2(1): 48-58

**Gowen LC**, Avrutskaya AV, Latour AM, Koller BH, Leadon SA, "BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage", *Science*, **1998**, 281(5379): 1009-1012

**Greene WC**, Chen LF, "Regulation of NF-kappaB action by reversible acetylation", *Novartis Found Symp*, 2004, 259, 208-217

**Gregorette IV**, Lee YM, Goodson HV, "Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis", *J Mol Biol*, **2004**, 338(1): 17-31

**Groh IAM**, Chen C, Lüske C, Cartus AT, Esselen M, "Plant polyphenols and oxidative metabolites of the herbal alkenylbenzene methyleugenol suppress histone deacetylase activity in human colon carcinoma cells", *J Nutr Metab*, **2013**, 821082

**Groh IAM**, Cartus AT, Vallicotti S, Kajzar J, Merz KH, Schrenk D, Esselen M, "Genotoxic potential of methyleugenol and selected methyleugenol metabolites in cultured Chinese hamster V79 cells", *Food Funct*, **2012**, (4): 428-436

**Grönroos E**, Hellman U, Heldin CH, Ericsson J. Grönroos E, Hellman U, Heldin CH, Ericsson J, "Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination", *J. Mol Cell*, **2002**, 10(3), 483-493

**Gstraunthaler G, Lindl T**, "Zell- und Gewebekultur", **2013**, *Springer Spektrum*, 7. Auflage, Berlin Heidelberg

**Gu W**, Roeder RG, "Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain", *Cell*, **1997**, 90(4): 595-606

**Guillouzo A**, "Liver Cell Models in in Vitro Toxicology", *Envir Health Pers*, **1998**, 106(2), 511-532

**Haber JE**, "Lucky breaks: analysis of recombination in *Saccharomyces*", *Mutat Res*, **2000**, 451(1-2): 53-69

**Hahnen E**, Hauke J, Tränkle C, Eyüpoglu IY, Wirth B, Blümcke I, "Histone deacetylase inhibitors: possible implications for neurodegenerative disorders", *Expert Opin Investig Drugs*, **2008**, 17(2): 169-184

**Hanahan D**, Weinberg RA, "The hallmarks of cancer", *Cell*, **2000**, 100(1): 57-70

**Hande KR**, "Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II", *Biochim Biophys Acta*, **1998**, 1400(1-3): 173-184

**Hashizume R**, Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y, Ogata H, Ohta T, "The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation", *J Biol Chem*, **2001**, 276(18): 14537-14540

**Hay RJ**, Macy ML, Chen TR, "Mycoplasma infection of cultured cells", *Nature*, **1989**, 339(6224): 487-488

**Hay RT**, Vuillard L, Desterro JM, Rodriguez MS, "Control of NF-kappa B transcriptional activation by signal induced proteolysis of I kappa B alpha", *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **1999**, 354(1389): 1601-1609

**Hay RT**, "Protein modification by SUMO", *Trends Biochem Sci*, **2001**, 26(5): 332-333

**Hay RT**, "SUMO: a history of modification", *Mol Cell*, **2005**, 18(1): 1-12

**Hecker CM**, Rabiller M, Haglund K, Bayer P, Dikic I, "Specification of SUMO1- and SUMO2-interacting motifs", *J Biol Chem*, **2006**, 281(23): 16117-16127

**Hengartner MO**, "The biochemistry of apoptosis", *Nature*, **2000**, 407(6805): 770-776

**Herrmann K**, Engst W, Appel KE, Monien BH, Glatt H, "Identification of human and murine sulfotransferases able to activate hydroxylated metabolites of methyleugenol to mutagens in *Salmonella typhimurium* and detection of associated DNA adducts using UPLC-MS/MS methods", *Mutagenesis*, **2012**, 27(4):453-462

**Herrmann K**, Schumacher F, Engst W, Appel KE, Klein K, Zanger UM, Glatt H, "Abundance of DNA adducts of methyleugenol, a rodent hepatocarcinogen, in human liver samples", *Carcinogenesis*, **2013**, 34(5): 1025-1030

**Herrmann K**, Engst W, Meini W, Florian S, Cartus AT, Schrenk D, Appel KE, Nolden T, Himmelbauer H, Glatt H, "Formation of hepatic DNA adducts by methyleugenol in mouse models: drastic decrease by Sult1a1 knockout and strong increase by transgenic human SULT1A1/2", *Carcinogenesis*, **2014**, 35(4): 935-941

**Herrmann K**, Engst W, Meini W, Florian S, Cartus AT, Schrenk D, Appel KE, Nolden T, Himmelbauer H, Glatt H, "Formation of hepatic DNA adducts by methyleugenol in mouse models: drastic decrease by Sult1a1 knockout and strong increase by transgenic human SULT1A1/2", *Carcinogenesis*, **2014**, 35(4): 935-941

**Hertog MG**, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D, "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study", *Lancet*, **1993**, 342(8878): 1007-1011

**Hirao A**, Cheung A, Duncan G, Girard PM, Elia AJ, Wakeham A, Okada H, Sarkissian T, Wong JA, Sakai T, De Stanchina E, Bristow RG, Suda T, Lowe SW, Jeggo PA, Elledge SJ, Mak TW, "Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner", *Mol Cell Biol*, **2002**, 22(18): 6521-6532

**Hjerrild M**, Milne D, Dumaz N, Hay T, Issinger OG, Meek D, "Phosphorylation of murine double minute clone 2 (MDM2) protein at serine-267 by protein kinase CK2 in vitro and in cultured cells", *Biochem J*, **2001**, 355(2), 347-356

**Hoeijmakers JH**, "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer", *Nature*, **2001**, 411(6835): 366-374

**Hoeijmakers JH**, "DNA repair mechanisms", *Maturitas*, **2001**, 38(1), 17-22

**Hofmann TG**, Möller A, Sirma H, Zentgraf H, Taya Y, Dröge W, Will H, Schmitz ML, "Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2", *Nat Cell Biol*, **2002**, 4(1): 1-10

**Holm C**, Covey JM, Kerrigan D, Pommier Y, "Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells", *Cancer Res*, **1989**, 49(22): 6365-6368

**Hong T**, Nakagawa T, Pan W, Kim MY, Kraus WL, Ikehara T, Yasui K, Aihara H, Takebe M, Muramatsu M, Ito T, "Isoflavones stimulate estrogen receptor-mediated core histone acetylation", *Biochem Biophys Res Commun*, **2004**, 317(1): 259-264

**Horn F**, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B, "Biochemie des Menschen", **2003**, *Gerorg Thieme Verlag*, 2. Auflage, Stuttgart

**Horn-Ross PL**, Barnes S, Lee M, Coward L, Mandel JE, Koo J, John EM, Smith M, "Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States)", *Cancer Causes Control*, **2000**, 11(4): 289-298

**Hosokawa N**, Hosokawa Y, Sakai T, Yoshida M, Marui N, Nishino H, Kawai K, Aoike A, "Inhibitory effect of quercetin on the synthesis of a possibly cell-cycle-related 17-kDa protein, in human colon cancer cells", *Int J Cancer*, **1990**, 45(6): 1119-1124

**Howell AB**, Vorsa N, Der Marderosian A, Foo LY, "Inhibition of the adherence of P-fimbriated Escherichia coli to uroepithelial-cell surfaces by proanthocyanidin extracts from cranberries", *N Engl J Med*, **1998**, 339(15),1085-1086

**Howell AB**, "Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health", *Crit Rev Food Sci Nutr*, **2002**, 42(3),273-278

**Hsiang YH**, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF, "Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I", *J Biol Chem*, 1985, 260(27): 14873-14878

**Hsiang YH**, Lihou MG, Liu LF, "Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin", *Cancer Res*, **1989**, 49(18), 5077-5082

**Huang TT**, Wuerzberger-Davis SM, Wu ZH, Miyamoto S, "Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress", *Cell*, **2003**, 115(5), 565-576

**Hubbert C**, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP, "HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase", *Nature*, **2002**, 417(6887), 455-458

**Hyson DA**, "A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health", *Adv Nutr*, **2011**, 2(5): 408-420

**Interthal H**, Pouliot JJ, Champoux JJ, "The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**, 98(21), 12009-12014

**Isaacs RJ**, Davies SL, Sandri MI, Redwood C, Wells NJ, Hickson ID, "Physiological regulation of eukaryotic topoisomerase II", *Biochim Biophys Acta*, **1998**, 1400(1-3), 121-137

**Ito A**, Kawaguchi Y, Lai CH, Kovacs JJ, Higashimoto Y, Appella E, Yao TP, "MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation", *EMBO J*, **2002**, 21(22): 6236-6245

**Jackson SP**, "Sensing and repairing DNA double-strand breaks", *Carcinogenesis*, **2002**, 23(5): 687-696

**Jaxel C**, Kohn KW, Wani MC, Wall ME, Pommier Y, "Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity", *Cancer Res*, **1989**, 49(6): 1465-1469

**Jendzelovský R**, Mikes J, Koval' J, Soucek K, Procházková J, Kello M, Sacková V, Hofmanová J, Kozubík A, Fedorocko P, Jendzelovský R1, Mikes J, Koval' J, Soucek K, Procházková J, Kello M, Sacková V, Hofmanová J, Kozubík A, Fedorocko P, "Drug efflux transporters, MRP1 and BCRP, affect the outcome of hypericin-mediated photodynamic therapy in HT-29 adenocarcinoma cells", *Photochem Photobiol Sci*, **2009**, 8(12), 1716-1723

**Jenner PM**, Hagan EC, Taylor JM, Cook EL, Fitzhugh OG, "Food Flavourings and compounds of related structure I Acute oral Toxicity", *Food cosmetic Toxicol*, **1964**, 2, 327-343

**Jenuwein T**, "Re-SET-ting heterochromatin by histone methyltransferases", *Trends Cell Biol*, **2001**, 11(6): 266-273

**Jenuwein T**, Allis CD, "Translating the histone code", *Science*, **2001**, 293(5532): 1074-1080

**Jeong** Youngtae, "Cracking Histone Deacetylases (HDACs)", 2008, *BoiWave* Vol. 10, No.3

**Jeurissen SM**, Bogaards JJP, Boersma MG, ter Horst JPF, Awad HM, Fiamegos YC, van Beek TA, Alink GM, Sudhölter EJ, Cnubben NHP, Rietjens JMCM, "Human Cytochrome P450 Enzymes of Importance for the Bioactivation of Methyleugenol to the proximate Carcinogen 1'-Hydroxymethyleugenol", *Chem. Res. Toxicol*, **2006**, 19, 111-116

**Jin M**, Kijima A, Hibi D, Ishii Y, Takasu S, Matsushita K, Kuroda K, Nohmi T, Nishikawa A, Umemura T, "In vivo genotoxicity of methyleugenol in gpt delta transgenic rats following medium-term exposure", *Toxicol Sci*, **2013**, 131(2): 387-394

**Jin Z, El-Deiry WS**, "Overview of cell death signaling pathways", *Cancer Biol Ther*, **2005**, 4(2): 139-163

**Johnson ES**, Gupta AA, "An E3-like factor that promotes SUMO conjugation to the yeast septins", *Cell*, **2001**, 106(6): 735-744

**Joukov V**, Chen J, Fox EA, Green JB, Livingston DM, "Functional communication between endogenous BRCA1 and its partner, BARD1, during *Xenopus laevis* development", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2001**, 98(21): 12078-12083

**Juan CC**, Hwang JL, Liu AA, Whang-Peng J, Knutsen T, Huebner K, Croce CM, Zhang H, Wang JC, Liu LF, "Human DNA topoisomerase I is encoded by a single-copy gene that maps to chromosome region 20q12-13.2", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1988**, 85(23): 8910-8913

**Jung M**, "Inhibitors of histone deacetylase as new anticancer agents", *Curr Med Chem*, **2001**, 8(12): 1505-1511

**Junran Z**, Simon N, Powell, "The Role of the BRCA1 Tumor Suppressor in DNA Double-Strand Break Repair", *Mol Cancer Res*, **2005**, 3: 531-539



- Kaboord B, Perr M**, "Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation", *Methods Mol Biol*, **2008**, 424: 349-364
- Kähkönen MP, Heinonen M**, "Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons", *J Agric Food Chem*, **2003**, 51(3): 628-633
- Kalfalah FM**, Mielke C, Christensen MO, Baechler S, Marko D, Boege, "Genotoxicity of dietary, environmental and therapeutic topoisomerase II poisons is uniformly correlated to prolongation of enzyme DNA residence", *Mol Nutr Food Res*, **2011**, 55(1): 127-142
- Kang N**, Wang MM, Wang YH, Zhang ZN, Cao HR, Lv YH2, Yang Y, Fan PH, Qiu F, Gao XM, "Tetrahydrocurcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis involving p38 MAPK activation in human breast cancer cells", *Food Chem Toxicol*, **2014**, 67: 193-200
- Karlson P**, Doenecke D, Koolman J, "Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler", *Georg Thieme Verlag*, **1994**, 14. Auflage, Stuttgart
- Kastan MB**, Lim DS, "The many substrates and functions of ATM", *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2000**, 1(3): 179-186
- Kaul TN**, Middleton E Jr, Ogra PL, "Antiviral effect of flavonoids on human viruses", *J Med Virol*, **1985**, 15(1): 71-79
- Keck JL**, Berger JM, "Enzymes that push DNA around", *Nat Struct Biol*, **1999**, 6(10): 900-902
- Kern M**, Tjaden Z, Ngiewih Y, Puppel N, Will F, Dietrich H, Pahlke G, Marko D, "Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract", *Mol Nutr Food Res*. **2005**; 49(4): 317-328
- Khan N**, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H, "Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate", *Cancer Res*, **2006**, 66(5): 2500-2505
- Khan SI**, Aumsuwan P, Khan IA, Walker LA, Dasmahapatra AK, "Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome", *Chem Res Toxicol*, **2012**, 25(1): 61-73
- Khanna KK, Jackson SP**, "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection", *Nat Genet*, **2001**, 27(3): 247-254
- Kikuno N**, Shiina H, Urakami S, Kawamoto K, Hirata H, Tanaka Y, Majid S, Igawa M, Dahiya R, "Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells", *Int J Cancer*, **2008**, 123(3): 552-560
- Kim KI**, Baek SH, "SUMOylation code in cancer development and metastasis", *Molecules and Cells*, **2006**, 22(3): 247-253

- Kim CH**, Park SJ, Lee SH, "A targeted inhibition of DNA-dependent protein kinase sensitizes breast cancer cells following ionizing radiation", *J Pharmacol Exp Ther*, **2002**, 303(2): 753-759
- Kim MJ**, Kim YJ, Park HJ, Chung JH, Leem KH, Kim HK, "Apoptotic effect of red wine polyphenols on human colon cancer SNU-C4 cells", *Food Chem Toxicol*, **2006**, 44(6): 898-902
- Kirkegaard K**, Wang JC, "Escherichia coli DNA topoisomerase I catalyzed linking of single-stranded rings of complementary base sequences", *Nucl. Acids Res*, **1978**, 5 (10): 3811-3820
- Kirsh O**, Seeler JS, Pichler A, Gast A, Müller S, Miska E, Mathieu M, Harel-Bellan A, Kouzarides T, Melchior F, Dejean A, "The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase", *EMBO J*, **2002**, 21(11): 2682-2691
- Knights CD**, Catania J, Di Giovanni S, Muratoglu S, Perez R, Swartzbeck A, Quong AA, Zhang X, Beerman T, Pestell RG, Avantaggiati ML, "Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate", *J Cell Biol*, **2006**, 173(4): 533-544
- Knippers R**, "Molekulare Genetik", *Thieme Verlag Stuttgart, New York, 7.Auflage*, **1997**
- Koeduka T**, Fridman E, Gang DR, Vassao DG, Jackson BL, Kish CM, Orlova I, Spassova SM, Lewis NG, Noel JP, Baiga TJ, Dudareva N, Pichersky E, "Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2006**, 103, 26, 10128- 10133
- Kovacs JJ**, Murphy PJ, Gaillard S, "HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor", *Mol Cell*, **2005**, 18, 601-607
- Kuendgen A**, Schmid M, Schlenk R, Knipp S, Hildebrandt B, Steidl C, Germing U, Haas R, Dohner H, Gattermann N, "The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia", *Cancer*, **2006**, 106(1): 112-119
- Kuo YH**, Chang CI, Li SY, Chou CJ, Chen CF, Kuo YH, Lee KH, "Cytotoxic constituents from the stems of *Diospyros maritima*", *Planta Med*, **1997**, 63(4):363-365.
- Laco GS**, Collins JR, Luke BT, Kroth H, Sayer JM, Jerina DM, Pommier Y, "Human topoisomerase I inhibition: docking camptothecin and derivatives into a structure-based active site model", *Biochemistry*, **2002**, 41(5): 1428-1435
- Lahue RS**, Frizzell A, "Histone deacetylase complexes as caretakers of genome stability", *Epigenetics*, **2012**, 7(8): 806-810
- Lairon D, Amiot MJ**, "Flavonoids in food and natural antioxidants in wine", *Curr Opin Lipidol*, **1999**, 10(1): 23-28

- Larsen AK**, Skladanowski A, Bojanowski K, "The roles of DNA topoisomerase II during the cell cycle", *Prog Cell Cycle Res*, **1996**, 2: 229-239
- Larsen AK**, Escargueil AE, Skladanowski A, "Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy", *Pharmacol Ther*, **2003**, 99(2): 167-181
- Larsen AK**, Escargueil AE, Skladanowski A, "From DNA damage to G2 arrest: the many roles of topoisomerase II", *Prog Cell Cycle Res*, **2003**, 5: 295-300
- Larsen AK, Gobert C**, "DNA topoisomerase I in oncology: Dr Jekyll or Mr Hyde?", *Pathology & Oncology Research*, **1999**, 5 (3), 171-178
- Leder A, Leder P**, "Butyric acid, a potent inducer of erythroid differentiation in cultured erythroleukemic cells", *Cell*, **1975**, 5(3): 319-322
- Lee JS**, Thorgeirsson SS, "Genome-scale profiling of gene expression in hepatocellular carcinoma: classification, survival prediction, and identification of therapeutic targets", *Gastroenterology*, **2004**, 127(5 Suppl 1): 51-55
- Lee MJ**, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS, "Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability", *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **2002**, 11(10 Pt 1): 1025-1032
- Lee SJ**, Krauthauser C, Maduskuie V, Fawcett PT, Olson JM, Rajasekaran SA, "Curcumin-induced HDAC inhibition and attenuation of medulloblastoma growth in vitro and in vivo", *BMC Cancer*, **2011**, 11:144
- Lee WJ**, Zhu BT, "Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols", *Carcinogenesis*, **2006**, 27(2): 269-277
- Levine AJ**, "p53, the cellular gatekeeper for growth and division", *Cell*, **1997**, 88(3): 323-331
- L'Hernault SW, Rosenbaum JL**, "Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine", *Biochemistry*, **1985**, 24(2): 473-478
- L'Hernault SW, Rosenbaum JL**, "Reversal of the posttranslational modification on Chlamydomonas flagellar alpha-tubulin occurs during flagellar resorption", *J Cell Biol*, **1985**, 100(2): 457-462
- Li CJ**, Averboukh L, Pardee AB, "beta-Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin", *J Biol Chem*, **1993**, 268(30): 22463-22468
- Li Y**, Liu L, Andrews LG, Tollefsbol TO, "Genistein depletes telomerase activity through cross-talk between genetic and epigenetic mechanisms", *Int J Cancer*, **2009**, 125(2): 286-296

**Li Y**, Kao GD, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Qin J, Phelan C, Lazar MA, "A novel histone deacetylase pathway regulates mitosis by modulating Aurora B kinase activity", *Genes Dev*, **2006**, 20(18): 2566-2579

**Sui L**, Wang Y, Ju LH, Chen M, "Epigenetic regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor genes in long-term potentiation in rat medial prefrontal cortex", *Neurobiol Learn Mem*, **2012**, 97(4): 425-440

**Lim SM**, Hwang JW, Ahn JB, Bae SK, Park CH, Kim KY, Rha SY, Chung HC, Roh JK, Shin SJ, "Combination of CYP inhibitor with MEK/ERK inhibitor enhances the inhibitory effect on ERK in BRAF mutant colon cancer cells", *Anticancer Res*, **2013**, 33(6): 2499-2508

**Lin RC**, Snodgrass PJ, "Primary culture of normal adult rat liver cells which maintain stable urea cycle enzymes", *Biochem Biophys Res Commun*, **1975**, 64(2): 725-734

**Lin RK**, Zhou N, Lyu YL, Tsai YC, Lu CH, Kerrigan J, Chen YT, Guan Z, Hsieh TS, Liu LF, "Dietary isothiocyanate- induced apoptosis via thiol modification of DNA topoisomerase IIa", *J Biol Chem*, **2011**, 286, 33591-33600

**Lindl T**, "Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählter Methoden und Anwendungen", 6. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Berlin Heidelberg*, **2008**

**Lindsey RH Jr**, Bromberg KD, Felix CA, Osheroff N, "1,4-Benzoquinone is a topoisomerase II poison", *Biochemistry*, **2004**, 43(23): 7563-7574

**Lindsey RH Jr**, Bender RP, Osheroff N, "Effects of benzene metabolites on DNA cleavage mediated by human topoisomerase II alpha: 1,4-hydroquinone is a topoisomerase II poison", *Chem Res Toxicol*, **2005**, 18(4): 761-770

**Link A**, Balaguer F, Goel A, "Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics", *Biochem Pharmacol*, **2010**, 80(12): 1771-1792

**Lisby M**, Olesen JR, Skouboe C, Krogh BO, Straub T, Boege F, Velmurugan S, Martensen PM, Andersen AH, Jayaram M, Westergaard O, Knudsen BR, "Residues within the N-terminal domain of human topoisomerase I play a direct role in relaxation", *J Biol Chem*, **2001**, 276(23): 20220-20227

**Liu M**, Wikonkal NM, Brash DE, "Induction of cyclin-dependent kinase inhibitors and G(1) prolongation by the chemopreventive agent N-acetylcysteine", *Carcinogenesis*, **1999**, 20(9): 1869-1872

**Liu LF**, Desai SD, Li TK, Mao Y, Sun M, Sim SP, "Mechanism of action of camptothecin", *Ann N Y Acad Sci*, **2000**, 922: 1-10

**Liu HL**, Chen Y, Cui GH, Zhou JF, "Curcumin a potent anti-tumor reagent, is a novel histone deacetylase inhibitor regulating B-NHL cell line Raji proliferation", *Acta Pharmacologica Sinica*, **2005**, 26 (5), 603-609

- Liu JF**, Sang CY, Xu XH, Zhang LL, Yang X, Hui L, Zhang JB, Chen SW, "Synthesis and cytotoxic activity on human cancer cells of carbamate derivatives of 4 $\beta$ -(1,2,3-triazol-1-yl)podophyllotoxin", *Eur J Med Chem*, **2013**, 64: 621-628
- Liu YP**, Chen HL, Tzeng CC, Lu PJ, Lo CW, Lee YC, Tseng CH, Chen YL, Yang CN, "TCH-1030 targeting on topoisomerase I induces S-phase arrest, DNA fragmentation, and cell death of breast cancer cells", *Breast Cancer Res Treat*, **2013**, 138(2): 383-393
- Löffler G**, "Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie", *Springer Verlag Berlin, Heidelberg*, 3.Auflage, **1999**
- Long LH**, Clement MV, Halliwell B, "Artifacts in cell culture: rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin-3-gallate on HIT-T15 pancreatic beta cell line", *Cell Biology and Toxicology*, **2000**, 26 (3), 189-199
- Long LH**, Kirkland D, Whitwell J, Halliwell B, "Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium", *Mutat Res*, **2007**, 634(1-2):177-183
- López-Lázaro M**, Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Austin CA, "Green tea constituents (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I- and topoisomerase II-DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide", *Mutagenesis*, **2011**, 26(4): 489-498
- Lord CJ, Ashworth A**, "The DNA damage response and cancer therapy", *Nature*, **2012**, 481(7381): 287-294
- Lottspeich F**, "Bioanalytik", *Spektrum Acad Verlag*, Heidelberg, **1998**
- Lowndes NF**, Murguía JR, "Sensing and responding to DNA damage", *Curr Opin Genet Dev*, **2000**, 10(1): 17-25
- Lu LY**, Ou N, Lu QB, "Antioxidant induces DNA damage, cell death and mutagenicity in human lung and skin normal cells", *Sci Rep*, **2013**, 3: 3169
- Lum BL, Gosland MP**, "MDR expression in normal tissues. Pharmacologic implications for the clinical use of P-glycoprotein inhibitors", *Hematol Oncol Clin North Am*, **1995**, 9(2): 319-336
- Luo G**, Qato MK, Guenther TM, "Hydrolysis of the 2',3'-allylic epoxides of allylbenzene, estragole, eugenol, and safrole by both microsomal and cytosolic epoxide hydrolases", *Drug Metab Dispos*, **1992**, 20(3): 440-445
- Luo G, Guenther TM**, "Metabolism of allylbenzene 2',3'-oxide and estragole 2',3'-oxide in the isolated perfused rat liver", *J Pharmacol Exp Ther*, **1995**, 272(2): 588-596

- Luttmann W**, Bratke K, Küpper M, Marytek D, "Der Experimentator: Immunologie", *Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin, 3. Auflage, 2008*
- Mah LJ**, El-Osta A, Karagiannis TC, "gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair", *Leukemia*, **2010**, 24(4):679-686
- Mahajan R**, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F, "A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2", *Cell*, **1997**, 88(1): 97-107
- Mailand N**, Falck J, Lukas C, Syljuâsen RG, Welcker M, Bartek J, Lukas J, "Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage", *Science*, **2000**, 288(5470): 1425-1429
- Majid S**, Dar AA, Ahmad AE, Hirata H, Kawakami K, Shahryari V, Saini S, Tanaka Y, Dahiya AV, Khatri G, Dahiya R, "BTG3 tumor suppressor gene promoter demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer", *Carcinogenesis*, **2009**, 30(4): 662-670
- Mann BS**, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R, "FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma", *Oncologist*, **2007**, 12(10): 1247-1252
- Mannironi C**, Bonner WM, Hatch CL, "H2A.X. a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals", *Nucleic Acids Res*, **1989**, 17(22): 9113-9126
- Mao Y**, Sun M, Desai SD, Liu LF, "SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: A possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2000**, 97(8): 4046-4051
- Maralhas A**, Monteiro A, Martins C, Kranendonk M, Laires A, Rueff J, Rodrigues AS, "Genotoxicity and endoreduplication inducing activity of the food flavouring eugenol", *Mutagenesis*, 21(3), 199-204, **2006**
- Marine JC**, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F, Lozano G, "Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4", *Cell Death Differ*, **2006**, 13(6): 927-9234
- Marks PA**, Richon VM, Breslow R, Rifkind RA, "Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs", *Curr Opin Oncol*, **2001**, 13(6): 477-483
- Marks P**, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK, "Histone deacetylases and cancer: causes and therapies", *Nat Rev Cancer*, **2001**, 1(3): 194-202
- Marks PA**, Richon VM, Miller T, Kelly WK, "Histone deacetylase inhibitors", *Adv Cancer Res*, **2004**, 91: 137-168
- Masters SC**, "Co-immunoprecipitation from transfected cells", *Methods Mol Biol*, **2004**, 261: 337-350

**Matunis MJ**, Coutavas E, Blobel G, "A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex", *J Cell Biol*, **1996**, 135(6 Pt 1): 1457-1470

**McArt DG**, McKerr G, Howard CV, Saetzler K, Wasson GR, "Modelling the comet assay", *Biochem. Soc. Trans*, **2009**, 37(4), 914-917

**McClendon AK**, Osheroff N, "DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer", *Mutat Res*, **2007**, 623(1-2): 83-97

**McDoniels-Silvers AL**, Stoner GD, Lubet RA, You M, "Differential expression of critical cellular genes in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas in comparison to normal lung tissues", *Neoplasia*, **2002**, 4(2): 141-150

**McDoniels-Silvers AL**, Nimri CF, Stoner GD, Lubet RA, You M, "Differential gene expression in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas", *Clin Cancer Res*, **2002**, 8(4): 1127-1138

**McKelvey-Martin VJ**, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De M  o MP, Collins A, "The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review", *Mutat Res*, **1993**, 288(1): 47-63

**Melchior F**, "SUMO--nonclassical ubiquitin", *Annu Rev Cell Dev Biol*, **2000**, 16: 591-626

**Mi Z**, Malak H, Burke TG, "Reduced albumin binding promotes the stability and activity of topotecan in human blood", *Biochemistry*, **1995**, 34(42): 13722-13728

**Middleton JR**, Chithan K, Theoharis C, "Theoharides1,2 The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells:Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer", *Pharmacological reviews*, **2000**, 52 (4), 673-751

**Miller EC**, Swanson AB, Phillips DH, Fletcher TL, Liem A, Miller JA, "Structre-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and the rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole", *Cancer Res*, **1983**, 43, 1124-1134

**Miller KM**, Tjeertes JV, Coates J, Legube G, Polo SE, Britton S, Jackson SP, "Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining", *Nat Struct Mol Biol*, **2010**, 17(9): 1144-1151

**Minotti G**, Recalcati S, Menna P, Salvatorelli E, Corna G, Cairo G, "Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms", *Methods Enzymol*, **2004**, 378: 340-361

**Mo YY**, Wang P, Beck WT, "Functional expression of human DNA topoisomerase I and its subcellular localization in HeLa cells", *Exp Cell Res*, **2000**, 256(2): 480-490

**Mo YY**, Wang C, Beck WT, "A novel nuclear localization signal in human DNA topoisomerase I", *J Biol Chem*, **2000**, 275(52): 41107-41113

- Modesti M, Kanaar R**, "DNA repair: spot(light)s on chromatin", *Curr Biol*, **2001**, 11(6): 229-232
- Modesti M, Kanaar R**, "Homologous recombination: from model organisms to human disease", *Genome Biol*, **2001**, 2(5)
- Moertel CG**, Schutt AJ, Reitemeier RJ, Hahn RG, "Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer", *Cancer Chemother Rep*, **1972**, 56(1): 95-101
- Möller B**, Herrmann K, "Quinic acid Esters of Hydroxycinnamic acids in stone and pome fruits", *Phytochemistry*, **1983**, 22, 477- 481
- Montariello D**, Troiano A, Malanga M, Calabrò V, Quesada P, "p63 involvement in poly(ADP-ribose) polymerase 1 signaling of topoisomerase I-dependent DNA damage in carcinoma cells", *Biochem Pharmacol*, **2013**, 85(7): 999-1006
- Moon YJ**, Wang X, Morris ME, "Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism", *Toxicol In Vitro*, **2006**, 20(2): 187-210
- Moradei O**, Maroun CR, Paquin I, Vaisburg A, "Histone deacetylase inhibitors: latest developments, trends and prospects", *Curr Med Chem Anticancer Agents*, **2005**, 5(5): 529-560
- Mortelmans K**, Haworth S, Lawlor T, Speck W, Tainer B, Zeiger E, "Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals", *Environ Mutagen*, **1986**, 8 Suppl 7: 1-119
- Moseley VR**, Morris J, Knackstedt RW, Wargovich MJ, "Green tea polyphenol epigallocatechin 3-gallate, contributes to the degradation of DNMT3A and HDAC3 in HCT 116 human colon cancer cells", *Anticancer Res*, **2013**, 33(12): 5325-5233
- Motoyama N, Naka K**, "DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability", *Curr Opin Genet Dev*, **2004**, 14(1): 11-16
- Mountzios G**, Dimopoulos MA, Papadimitriou C, "Excision Repair Cross-Complementation Group 1 Enzyme as a Molecular Determinant of Responsiveness to Platinum-Based Chemotherapy for non Small-Cell Lung Cancer", *Biomark Insights*, **2008**, 3: 219-226
- Moynahan ME**, Chiu JW, Koller BH, Jasin M, "Brca1 controls homology-directed DNA repair", *Mol Cell*, **1999**, 4(4): 511-518
- Mross K**, Richly H, Schleucher N, Korfee S, Tewes M, Scheulen ME, Seeber S, Beinert T, Schweigert M, Sauer U, Unger C, Behringer D, Brendel E, Haase CG, Voliotis D, Strumberg D, "A phase I clinical and pharmacokinetic study of the camptothecin glycoconjugate, BAY 38-3441, as a daily infusion in patients with advanced solid tumors", *Ann Oncol*, **2004**, 15(8): 1284-1294



**Mu JJ**, Tsay YG, Juan LJ, Fu TF, Huang WH, Chen DS, Chen PJ, "The small delta antigen of hepatitis delta virus is an acetylated protein and acetylation of lysine 72 may influence its cellular localization and viral RNA synthesis", *Virology*, **2004**, 319(1): 60-70

**Muggia FM**, Creaven PJ, Hansen HH, Cohen MH, Selawry OS, "Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-100880): correlation with preclinical studies", *Cancer Chemother Rep*, **1972**, 56(4): 515-521

**Muller S**, Berger M, Lehembre F, Seeler JS, Haupt Y, Dejean A, "c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification", *J Biol Chem*, **2000**, 275(18): 13321-13329

**Naguleswaran A**, Spicher M, Vonlaufen N, Ortega-Mora LM, Torgerson P, Gottstein B, Hemphill A. In vitro metacestodicidal activities of genistein and other isoflavones against *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus granulosus*, *Antimicrob Agents Chemother*, **2006**, 50(11), 3770-3778

**Nandakumar V**, Vaid M, Katiyar SK, "(-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells", *Carcinogenesis*, **2011**, 32(4): 537-544

**Nitiss J, Wang JC**, "DNA topoisomerase-targeting antitumor drugs can be studied in yeast", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1988**, 85(20): 7501-7505

**Nitiss JL**, "DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions", *Nat Rev Cancer*, **2009**, 9(5): 327-337

**Nitiss JL**, "Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy", *Nat Rev Cancer*, **2009**, 9(5): 338-350

**Nomizu T**, Tsuchiya A, Kanno M, Katagata N, Watanabe F, Yamaki Y, Abe R, Miki Y, "Clinicopathological Features of Hereditary Breast Cancer", *Breast Cancer*, **1997**, 4(4): 239-242

**National Toxicology Program (NTP)**, "Toxicology and carcinogenesis studies of methyleugenol in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies)", *DRAFT NTP-TR-491, NIH, Publication No 98-3950*, **2000**

**Obe G**, Johannes C, Schulte-Frohlinde D, "DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation", *Mutagenesis*, **1992**, 7(1): 3-12

**Olsen EA**, Kim YH, Kuzel TM, Pacheco TR, Foss FM, Parker S, Frankel SR, Chen C, Ricker JL, Arduino JM, Duvic M, "Phase IIb multicenter trial of vorinostat in patients with persistent, progressive, or treatment refractory cutaneous T-cell lymphoma", *J Clin Oncol*, **2007**, 25(21): 3109-3115

**Olthof MR**, Hollman PC, Katan MB, "Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans", *J Nutr*, **2001**, 131(1): 66-71

- Olthof MR**, Hollman PC, Buijsman MN, van Amelsvoort JM, Katan MB, "Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans", *J Nutr*, **2003**, 133(6): 1806-1814
- Ostling O**, Johanson KJ, "Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells", *Biochem. Biophys. Res*, **1984**, 123(1): 291-298
- Palii SS**, Cui Y, Innes CL, Paules RS, "Dissecting cellular responses to irradiation via targeted disruptions of the ATM-CHK1-PP2A circuit", *Cell Cycle*, **2013**, 12(7): 1105-1118
- Pandey M**, Shukla S, Gupta S, "Promoter demethylation and chromatin remodeling by green tea polyphenols leads to re-expression of GSTP1 in human prostate cancer cells", *Int J Cancer*, **2010**, 126(11):2520-2533
- Papouli E**, Chen S, Davies AA, Huttner D, Krejci L, Sung P, Ulrich HD, "Crosstalk between SUMO and ubiquitin on PCNA is mediated by recruitment of the helicase Srs2p", *Mol Cell*, **2005**, 19(1): 123-133
- Paull TT**, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM, "A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage", *Curr Biol*, **2000**, 10(15): 886-895
- Peng G, Lin SY**, "Exploiting the homologous recombination DNA repair network for targeted cancer therapy World", *J Clin Oncol*, **2011**, 2(2): 73-79
- Pero RW**, Sheng Y, Olsson A, Bryngelsson C, Lund-Pero M, "Hypochlorous acid/N-chloramines are naturally produced DNA repair inhibitors", *Carcinogenesis*, **1996**, 17(1): 13-18
- Pichierri P**, Franchitto A, Palitti F, "Predisposition to cancer and radiosensitivity Gene", *Mol. Biol*, **2000**, 23(4)
- Pommier Y**, Kerrigan D, Hartman KD, Glazer RI, "Phosphorylation of mammalian DNA topoisomerase I and activation by protein kinase C", *J Biol Chem*, **1990**, 265(16): 9418-9422
- Pommier Y**, Pourquier P, Fan Y, Strumberg D, "Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme", *Biochim Biophys Acta*, **1998**, 1400(1-3): 83-105
- Pommier Y**, Pourquier P, Urasaki Y, Wu J, Laco GS, "Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance", *Drug Resist Updat*, **1999**, 2(5): 307-318
- Pommier Y**, Leo E, Zhang H, Marchand C, "DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs", *Chem Biol*, **2010**, 17(5): 421-433
- Pommier Y, Marchand C**, "Interfacial inhibitors: targeting macromolecular complexes", *Nat Rev Drug Discov*, **2011**, 11(1):25-36

**Pommier Y**, "Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I with camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints", *Curr Med Chem Anticancer Agents*, **2004**, 4(5): 429-434

**Pommier Y**, "DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition", *Chem Rev*, **2009**, 109(7): 2894-2902

**Pommier Y**, "Drugging topoisomerases: lessons and challenges", *ACS Chem Biol*, **2013**, 8(1): 82-95

**Pool-Zobel BL**, Selvaraju V, Sauer J, Kautenburger T, Kiefer J, Richter KK, Soom M, Wölfl S, "Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics", *Carcinogenesis*, **2005**, 26(6): 1064-1076

**Pourquier P, Pommier Y**, "Topoisomerase I-mediated DNA damage", *Adv Cancer Res*, **2001**, 80: 189-216

**Prietsch RF**, Monte LG, da Silva FA, Beira FT, Del Pino FA, Campos VF, Collares T, Pinto LS, Spanevello RM, Gamaro GD, Braganhol E, "Genistein induces apoptosis and autophagy in human breast MCF-7 cells by modulating the expression of proapoptotic factors and oxidative stress enzymes", *Mol Cell Biochem*, **2014**, 390(1-2):235-242

**Qi W**, Weber CR, Wasland K, Savkovic SD, "Genistein inhibits proliferation of colon cancer cells by attenuating a negative effect of epidermal growth factor on tumor suppressor FOXO3 activity", *BMC Cancer*, **2011**, 11:219

**Qui Y**, Zhao Y, Becker M, John S, Parekh BS, Huang S, Hendarwanto A, Martinez ED, Chen Y, Lu H, Adkins NL, Stavreva DA, Wiench M, Georgel PT, Schiltz RL, Hager GL, "HDAC1 acetylation is linked to progressive modulation of steroid receptor-induced gene transkription", *Mol Cell*, **2006**, 22(5), 669-679

**Rafter J**, Govers M, Martel P, Pannemans D, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Rowland I, Tuijtelars S, van Loo J, "PASSCLAIM--diet-related cancer", *Eur J Nutr*, **2004**, 43 Suppl 2: 1147-1184

**Rajendran P**, Ho E, Williams DE, Dashwood RH, "Dietary phytochemicals, HDAC inhibition, and DNA damage/repair defects in cancer cells", *Clin Epigenetics*, **2011**, 3(1):4

**Rajendran P**, Williams DE, Ho E, Dashwood RH, "Metabolism as a key to histone deacetylase inhibition", *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **2011**, 46(3): 181-199

**Rajendran P**, Kidane AI, Yu TW, Dashwood WM, Bisson WH, Löhr CV, Ho E, Williams DE, Dashwood RH, "HDAC turnover, CtIP acetylation and dysregulated DNA damage signaling in colon cancer cells treated with sulforaphane and related dietary isothiocyanates", *Epigenetics*, **2013**, 8(6): 612-623

- Razin S**, Yogev D, Naot Y, "Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(4), 1094-1156, **1998**
- Redinbo MR**, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ, Hol WG, "Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA", *Science*, **1998**, 279(5356): 1504-1513
- Redon C**, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W, "Histone H2A variants H2AX and H2AZ", *Curr Opin Genet Dev*, **2002**, 12(2): 162-169
- Rietjens IM**, Boersma MG, van der Woude H, Jeurissen SM, Schutte ME, Alink GM, "Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk", *Mutat Res*, **2005**, 574(1-2): 124-138
- Rietjens IM**, Martena MJ, Boersma MG, Spiegelberg W, Alink GM, "Molecular mechanisms of toxicity of important food-borne phytotoxins", *Mol Nutr Food Res*, **2005**, 49(2): 131-158
- Riggs MG**, Whittaker RG, Neumann JR, Ingram VM, "n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells", *Nature*, **1977**, 268(5619): 462-454
- Robison SH**, Barr DB, "Use of Biomonitoring Data to Evaluate Methyl Eugenol Exposure", *Environmental Health Perspectives Research*, vol.114, 11, **2006**
- Roca J**, "The torsional state of DNA within the chromosome", *Chromosoma*, **2011**, 120(4): 323-334
- Roesky, Möckel**, "Chemische Karbinettstücke", *VCH, Weinheim*, **1996**, 160-162
- Rogakou EP**, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM, "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139", *J Biol Chem*, **1998**, 273(10): 5858-5868
- Ross JA**, Kasum CM, "Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety", *Annu Rev Nutr*, **2002**, 22:19-34
- Rübben H**, Vom Dorp F, Eisenhard A, Goebell PJ, Gschwend J, Jäger T, Jakse G, Jocham D, Karl A, Krege S, Lümme G, Otto T, Rettenmeier A, Rödel C, Rübben H, Schenck M, Schmid KW, Stief C, Stöckle M, Zaak D, "Uroonkologie", *Springer Medizin Verlag*, **2009**, 5. Auflage, Heidelberg
- Sakanaka S**, Aizawa M, Kim M, Yamamoto T, "Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of an oral bacterium, *Porphyromonas gingivalis*", *Biosci Biotechnol Biochem*, **1996**, 60(5):745-749
- Saldanha SN**, Kala R, Tollefsbol TO, "Molecular mechanisms for inhibition of colon cancer cells by combined epigenetic-modulating epigallocatechin gallate and sodium butyrate", *Exp Cell Res*, **2014**, 324(1): 40-53

- Saldanha SN**, Kala R, Tollefsbol TO, "Molecular mechanisms for inhibition of colon cancer cells by combined epigenetic-modulating epigallocatechin gallate and sodium butyrate", *Exp Cell Res*, **2014**, 324(1):40-53
- Sarge KD, Park-Sarge OK**, "Sumoylation and human disease pathogenesis", *Trends Biochem Sci*, **2009**, 34(4):200-205
- Sarge KD, Park-Sarge OK**, "Detection of proteins sumoylated in vivo and in vitro", *Methods Mol Biol*, **2009**, 590: 265-277
- Sarkadi B**, Ozvegy-Laczka C, Németh K, Váradi A, "ABCG2 -- a transporter for all seasons", *FEBS Lett*, **2004**, 567(1): 116-120
- Savitsky K**, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y, "A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase", *Science*, **1995**, 268(5218): 1749-1753
- Scalbert A**, Williamson G, "Dietary intake and bioavailability of polyphenols", *J Nutr*, **2000**, 130(8S Suppl): 2073-2085
- Scalbert A**, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L, "Dietary polyphenols and the prevention of diseases", *Crit Rev Food Sci Nutr*, **2005**, 45(4): 287-306
- Scientific Committee of Food (SCF)**, "Opinion of the Scientific Committee of Food on Methyleugenol (4-Allyl-1,2- dimethoxybenzene)", **26.09.2001**
- Schaefer S**, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Janzowski C, "Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines", *Mol Nutr Food Res*, **2006**, 50(1):24-33
- Schiestl RH**, Chan WS, Gietz RD, Mehta RD, Hastings PJ, "Safrole, eugenol and methyleugenol induce intrachromosomal recombination in yeast", *Mutat Res*, **1989**, 224(4): 427-436
- Schmidt J**, Erfle V, "Elimination of mycoplasmas from cell cultures and establishment of mycoplasma-free cell lines", *Exp Cell Res*, **1984**, 152(2): 565-570
- Schmidt BH**, Osheroff N, Berger JM, "Structure of a topoisomerase II-DNA-nucleotide complex reveals a new control mechanism for ATPase activity", *Nat Struct Mol Biol*, **2012**, 19(11): 1147-1154
- Schultz LB**, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD, "p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks", *J Cell Biol*, **2000**, 151(7): 1381-1390
- Schwienhorst I**, "Konjugation und Dekonjugation des Ubiquitin-ähnlichen Proteins SUMO in *Saccharomyces cerevisiae*", *Dissertation*, Köln, **2001**

- Scully R**, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J, Livingston DM, "Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage", *Cell*, **1997**, 90(3): 425-435
- Seeler JS**, Bischof O, Nacerddine K, Dejean A, "SUMO, the three Rs and cancer", *Curr Top Microbiol Immunol*, **2007**, 313: 49-71
- Sekizawa J**, Shibamoto T, "Genotoxicity of safrole-related chemicals in microbial test systems", *Mutat Res*. **1982**, 101(2): 127-140
- Sengupta N**, Seto E, "Regulation of histone deacetylase activities", *J Cell Biochem*, **2004**, 93(1): 57-67
- Sesso HD**, Gaziano JM, Liu S, Buring JE, "Flavonoid intake and the risk of cardiovascular disease in women", *Am J Clin Nutr*, **2003**, 77(6): 1400-1408
- Shiio Y, Eisenman RN**, "Histone sumoylation is associated with transcriptional repression", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2003**, 100(23): 13225-13230
- Shilatifard A**, "Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression", *Annu Rev Biochem*, **2006**, 75: 243-269
- Shiloh Y**, "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity", *Nat Rev Cancer*, **2003**, 3(3): 155-168
- Shiloh Y**, "ATM: ready, set, go", *Cell Cycle*, **2003**, 2(2): 116-117
- Singh NP**, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL, "A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells", *Exp. Cell Res*, 175, 184-191, **1988**
- Sirikantaramas S**, Yamazaki M, Saito K, "Mutations in topoisomerase I as a self-resistance mechanism coevolved with the production of the anticancer alkaloid camptothecin in plants", *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2008**, 105(18): 6782-6786
- Skehan P**, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR, "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening", *J Natl Cancer Inst*, **1990**, 82(13): 1107-1112
- Smith RL**, Adams TB, Doull J, Feron VJ, Goodman JI, Marnett LJ, Portoghese PS, Waddell WJ, Wagner BM, Rogers AE, Caldwell J, Sipes IG, "Safety assessment of allylalkoxybenzene derivatives used as flavouring substances- methyl eugenol and estragole", *Food and Chemical Toxicol*, **2002**, 40 (7): 851-870
- Smith B**, Cadby P, Leblanc JC, Woordow Setzer R, "Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic Example: Methyleugenol, CASRN: 93-15-2", *Food and Chemical Toxicology*, 48, 89-97, **2010**

**Sneyd J**, "Kapern und die Kapernpflanze in der Natur, Küche und Heilkunde", 1.Auflage, *Books on demand GmbH, Norderstedt*, **2009**

**Solheim E, Scheline RR**, "Metabolism of Alkenebenzene Derivatives in the Rat. II. Eugenol and Isoeugenol Methyl Ethers", *Xenobiotica*, **1976**, vol.6, no 3, 137-150

**Sordet O**, Khan QA, Kohn KW, Pommier Y, "Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors", *Curr Med Chem Anticancer Agents*, **2003**, 3(4): 271-290

**Sørensen CS**, Syljuåsen RG, Falck J, Schroeder T, Rønnstrand L, Khanna KK, Zhou BB, Bartek J, Lukas J, "Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A", *Cancer Cell*, **2003**, 3(3): 247-258

**Soyalan B**, Minn J, Schmitz HJ, Schrenk D, Will F, Dietrich H, Baum M, Eisenbrand G, Janzowski C, "Apple juice intervention modulates expression of ARE-dependent genes in rat colon and liver", *Eur J Nutr*, **2011**, 50(2): 135-143

**Spange S**, Wagner T, Heinzel T, Krämer OH, "Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels", *Int J Biochem Cell Biol*, **2009**, 41(1): 185-198

**Stewart L**, Ireton GC, Champoux JJ, "The domain organization of human topoisomerase I", *J Biol Chem*, **1996**, 271(13): 7602-7608

**Stewart L**, Ireton GC, Parker LH, Madden KR, Champoux JJ, "Biochemical and biophysical analyses of recombinant forms of human topoisomerase I", *J Biol Chem*, **1996**, 271(13): 7593-7601

**Stewart L**, Redinbo MR, Qiu X, Hol WG, Champoux JJ, "A model for the mechanism of human topoisomerase I", *Science*, **1998**, 279(5356): 1534-1541

**Stewart L**, Ireton GC, Champoux JJ, "Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation", *J Mol Biol*, **1997**, 269(3): 355-372

**Stewart GS**, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ, "MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint", *Nature*, **2003**, 421(6926):961-966

**Stofberg FG, Grundschober F**, "Consumption ratio and food predominance of flavoring materials", *Perfum. Flavor*, 12, 27, **1987**

**Subramanian D**, Furbee CS, Muller MT, "ICE bioassay. Isolating in vivo complexes of enzyme to DNA", *Methods Mol Biol*, **2001**, 95:137-147

**Suh KS**, Chon S, Oh S, Kim SW, Kim JW, Kim YS, Woo JT, "Prooxidative effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate on the HIT-T15 pancreatic beta cell line", *Cell Biol Toxicol*, **2010**, 26(3): 189-199

**Swanson AB**, Chambliss DD, Blomquist JC, Miller EC, Miller JA, "The mutagenicities of safrole, estragole, eugenol, trans-anethole, and some of their known or possible metabolites for *Salmonella typhimurium* mutants", *Mutat. Res*, **1979**, 60(2): 143-153

**Syrovets T**, Büchele B, Gedig E, Slupsky JR, Simmet T, "Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and IIalpha", *Mol Pharmacol*, **2000**, 58(1): 71-81

**Takai H**, Naka K, Okada Y, Watanabe M, Harada N, Saito S, Anderson CW, Appella E, Nakanishi M, Suzuki H, Nagashima K, Sawa H, Ikeda K, Motoyama N, "Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription", *EMBO J*, **2002**, 21(19): 5195-5205

**Tan KB**, Dorman TE, Falls KM, Chung TD, Mirabelli CK, Crooke ST, Mao J, "Topoisomerase II alpha and topoisomerase II beta genes: characterization and mapping to human chromosomes 17 and 3, respectively", *Cancer Res*, **1992**, 52(1): 231-234

**Teves SS**, **Henikoff S**, "Transcription-generated torsional stress destabilizes nucleosomes", *Nat Struct Mol Biol*, **2014**, 21(1): 88-94

**Thakur VS**, Gupta K, Gupta S, "Green tea polyphenols causes cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells by suppressing class I histone deacetylases", *Carcinogenesis*, **2012**, 33(2): 377-384

**Thielen S**, "Charakterisierung DNA-schädigender Wirkungen mittels Comet Assay und hPRT-Genmutations-Assay: Ein Vergleich zwischen alpha, beta-ungesättigten Carbonylverbindungen, Epoxiden und N-Nitroso-verbindungen", *Dissertation*, **2007**, TU Kaiserslautern

**Thompson HM**, Cao H, Chen J, Euteneuer U, McNiven MA, "Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion", *Nat Cell Biol*, **2004**, 6(4): 335-342

**Timmel MA**, Byl JA, Osheroff N, "Epimerization of green tea catechins during brewing does not affect the ability to poison human type II topoisomerases", *Chem Res Toxicol*, **2013**, 26(4):622-8

**Tomicic MT**, Kaina B, "Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors", *Biochim Biophys Acta*, **2013**, 1835(1): 11-27

**Tselepi M**, Papachristou E, Emmanouilidi A, Angelis A, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Kouretas D, Liadaki K, "Catalytic inhibition of eukaryotic topoisomerases I and II by flavonol glycosides extracted from *Vicia faba* and *Lotus edulis*", *J Nat Prod*, **2011**, 74(11): 2362-2370

**Ufelmann H**, "Toxikologische Relevanz des Vorkommens von Desmethyl-Varianten der Microcystine und des Nodularins in Gewässern und Nahrungsergänzungsmitteln", *Dissertation*, **2012**, TU Kaiserslautern

**Uphoff CC**, Drexler HG, "Comparative antibiotic eradication of mycoplasma infections from continuous cell lines", *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **2002**, 38(2): 86-89



- van den Berg SJ**, Serra-Majem L, Coppens P, Rietjens IM, "Safety assessment of plant food supplements (PFS)", *Food Funct*, **2011**, 2(12): 760-768
- van Gent DC**, Hoeijmakers JH, Kanaar R, "Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection", *Nat Rev Genet*, **2001**, 2(3): 196-206
- Vanhaecke T**, Papeleu P, Elaut G, Rogiers V, "Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view", *Curr Med Chem*, **2004**, 11(12): 1629-1643
- Vanhaecke T**, Henkens T, Kass GE, Rogiers V, "Effect of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A on spontaneous apoptosis in various types of adult rat hepatocyte cultures", *Biochem Pharmacol*, **2004**, 68(4): 753-760
- Vanommeslaeghe K**, Van Alsenoy C, De Proft F, Martins JC, Tourwé D, Geerlings P, "Ab initio study of the binding of Trichostatin A (TSA) in the active site of histone deacetylase like protein (HDLP)", *Org Biomol Chem*, **2003**, 1(16): 2951-2957
- Vega RB**, Harrison BC, Meadows E, Roberts CR, Papst PJ, Olson EN, McKinsey TA, "Protein kinases C and D mediate agonist-dependent cardiac hypertrophy through nuclear export of histone deacetylase 5", *Mol Cell Biol*, **2004**, 24(19): 8374-8385
- Verdone L**, Agricola E, Caserta M, Di Mauro E, "Histone acetylation in gene regulation", *Brief Funct Genomic Proteomic*, **2006**, 5(3): 209-221
- Vigushin DM**, Ali S, Pace PE, Mirsaidi N, Ito K, Adcock I, Coombes RC, "Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo", *Clin. Cancer Res*, **2001**, 7(4): 971-976
- Wahl GM**, Carr AM, "The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53", *Nat. Cell Biol*, **2001**, 3(12): 277-286
- Waldecker M**, Kautenburger T, Daumann H, Busch C, Schrenk D, "Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon", *J. Nutr Biochem*, **2008**, 19(9): 587-593
- Wall ME**, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA, "Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*", *J. Am. Chem. Soc*, **1966**, 88(16): 3888-3890
- Wang W**, Tanaka Y, Han Z, Higuchi CM, "Proliferative response of mammary glandular tissue to formononetin", *Nutr Cancer*, **1995**, 23(2): 131-140
- Wang H**, Mao Y, Zhou N, Hu T, Hsieh TS, Liu LF, "Atp-bound topoisomerase ii as a target for antitumor drugs", *J Biol Chem*, **2001**, 276(19): 15990-15995
- Wang B**, Matsuoka S, Carpenter PB, Elledge SJ, "53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint", *Science*, **2002**, 298(5597): 1435-1438

**Wang JC**, "Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective", *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2002**, 3(6): 430-440

**Ward IM**, Minn K, van Deursen J, Chen J, "p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice", *Mol Cell Biol*, **2003**, 23(7): 2556-2563

**Ward IM**, Chen J, "Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress", *J Biol Chem*, **2001**, 276(51): 47759-47762

**Wasson GR**, McKelvey-Martin VJ, Downes CS, "The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer", *Mutagenesis*, **2008**, 23(3), 153-162

**Watson JD**, "Die Doppel.Helix", *Rowohlt Taschenbuch Verlag GmbH*, **1973**, Hamburg

**Watters GP**, Smart DJ, Harvey JS, Austin CA, "H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint", *Mutat Res*, **2009**, 679(1-2): 50-58

**Watzl B**, Bub A, Briviba K, Rechkemmer G, "Acute intake of moderate amounts of red wine or alcohol has no effect on the immune system of healthy men", *Eur J Nutr*, **2002**, 41(6): 264-270

**Wei YH**, "Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging", *Proc Soc Exp Biol Med*, **1998**, 217(1): 53-63

**Weichert W**, Röske A, Gekeler V, Beckers T, Ebert MP, Pross M, Dietel M, Denkert C, Röcken C, "Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis", *Lancet Oncol*, **2008**, 9(2):139-48

**Weisel T**, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Stockis JP, Kulling S, Rüfer C, Johannes C, Janzowski C, "An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands", *Biotechnol J*, **2006**, 1(4): 388-397

**Williams GM**, Iatropoulos MJ, Jeffrey AM, Duan JD, "Methyleugenol hepatocellular cancer initiating effects in rat liver", *Food Chem Toxicol*, **2013**, 53: 187-196

**Williamson G**, "Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion", *Mol Nutr Food Res*, **2013**, 57(1): 48-57

**Wilstermann AM**, Osheroff N, "Stabilization of eukaryotic topoisomerase II-DNA cleavage complexes", *Curr Top Med Chem*, **2003**, 3(3): 321-338

**Xu X**, Tsvetkov LM, Stern DF, "Chk2 activation and phosphorylation-dependent oligomerization", *Mol Cell Biol*, **2002**, 22(12): 4419-4432

**Yafune A**, Taniai E, Morita R, Nakane F, Suzuki K, Mitsumori K, Shibutani M, "Expression patterns of cell cycle proteins in the livers of rats treated with hepatocarcinogens for 28 days", *Arch Toxicol*, **2013**, 87(6): 1141-1153

**Yang SK**, McCourt DW, Leutz JC, Gelboin HV, "Benzo[a]pyrene diol epoxides: mechanism of enzymatic formation and optically active intermediates.

Benzo[a]pyrene diol epoxides: mechanism of enzymatic formation and optically active intermediates", *Science*, **1977**, 196(4295):1199-11201

**Yang CS**, Prabhu S, Landau J, "Prevention of carcinogenesis by tea polyphenols", *Drug Metab Rev*, **2001**, 33(3-4): 237-253

**Yang CS, Wang ZY**, "Tea and cancer", *J Natl Cancer Inst*, **1993**, 85(13):1038-1049

**Yarden RI**, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC, "BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage", *Nat Genet*, **2002**, 30(3): 285-289

**Yazdi PT**, Wang Y, Zhao S, Patel N, Lee EY, Qin J, "SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint", *Genes Dev*, **2002**, 16(5): 571-582

**Yonezawa Y**, Hada T, Uryu K, Tsuzuki T, Eitsuka T, Miyazawa T, Murakami-Nakai C, Yoshida H, Mizushina Y, "Inhibitory effect of conjugated eicosapentaenoic acid on mammalian DNA polymerase and topoisomerase activities and human cancer cell proliferation", *Biochem Pharmacol*, **2005**, 70(3): 453-460

**Yonezawa Y**, Tsuzuki T, Eitsuka T, Miyazawa T, Hada T, Uryu K, Murakami-Nakai C, Ikawa H, Kuriyama I, Takemura M, Oshige M, Yoshida H, Sakaguchi K, Mizushina Y, "Inhibitory effect of conjugated eicosapentaenoic acid on human DNA topoisomerases I and II", *Arch Biochem Biophys*, **2005**, 435(1): 197-206

**Yonezawa Y**, Hada T, Uryu K, Tsuzuki T, Nakagawa K, Miyazawa T, Yoshida H, Mizushina Y, "Mechanism of cell cycle arrest and apoptosis induction by conjugated eicosapentaenoic acid, which is a mammalian DNA polymerase and topoisomerase inhibitor", *Int J Oncol*, **2007**, 30(5): 1197-1204

**Yoshida M**, Horinouchi S, Beppu T, "Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function", *Bioessays*, **1995**, 17(5): 423-430

**Yoshida M**, Kijima M, Akita M, Beppu T, "Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A", *J Biol Chem*, **1990**, 265(28): 17174-17179

**Yu Z**, Li W, Liu F, "Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells", *Cancer Lett*, **2004**, 215(2): 159-166

**Yuan J**, Yankner BA, "Apoptosis in the nervous system", *Nature*, **2000**, 407(6805): 802-809

**Yun HJ**, Hyun SK, Park JH, Kim BW, Kwon HJ, "Widdrol activates DNA damage checkpoint through the signaling Chk2-p53-Cdc25A-p21-MCM4 pathway in HT29 cells", *Mol Cell Biochem*, **2012**, 363(1-2): 281-289

- Yuquan L**, Takeshita T, Morimoto K, "Effects of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) on DNA strand breaks as evaluated by single-cell gel electrophoresis (SCG) in human lymphocytes", *Environ Health Prev Med*, **2001**, 5(4): 150-154
- Zhang Q**, Yao H, Vo N, Goodman RH, "Acetylation of adenovirus E1A regulates binding of the transcriptional coexpressor CtBP", *Proc Natl Acad Sci*, **2000**, 97(26), 14323-14328
- Zhang CL**, McKinsey TA, Olson EN, "Association of class II histone deacetylases with heterochromatin protein 1: potential role for histone methylation in control of muscle differentiation", *Mol Cell Biol*, **2002**, 22(20): 7302-7312
- Zhang T**, Tan Y, Zhao R, Liu Z, "DNA damage induced by oridonin involves cell cycle arrest at G2/M phase in human MCF-7 cells", *Contemp Oncol*, **2013**, 17(1):38-44
- Zhao S**, Renthal W, Lee EY, "Functional analysis of FHA and BRCT domains of NBS1 in chromatin association and DNA damage responses", *Nucleic Acids Res*, **2002**, 30(22): 4815-4822
- Zhou GD**, Moorthy B, Bi J, Donnelly KC, Randerath K, "DNA adducts from alkoxyallylbenzene herb and spice constituents in cultured human (HepG2) cells", *Environ Mol Mutagen*, **2007**, 48(9): 715-721
- Zhou SF**, Xue CC, Yu XQ, Wang G, "Metabolic activation of herbal and dietary constituents and its clinical and toxicological implications: an update", *Curr Drug Metab*, **2007**, 8(6): 526-553
- Zhou BB**, Elledge S, "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective", *Nature*, **2000**, 408(6811): 433-439
- Zhu P**, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Göttlicher M, "Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis", *Cancer Cell*, **2004**, 5(5): 455-463
- Zou L**, Elledge SJ, "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes", *Science*, **2003**, 300(5625):1542-1548
- Zupkó I**, Molnár J, Réthy B, Minorics R, Frank E, Wölfling J, Molnár J, Ocsovszki I, Topcu Z, Bitó T, Puskás LG, "Anticancer and multidrug resistance-reversal effects of solanidine analogs synthesized from pregnadienolone acetate", *Molecules*, **2014**, 19(2): 2061-2076

## Abbildungsverzeichnis

ABB.1: DNA-STRUKTUR, WATSON-CRICK-STRUKTUR .....	- 3 -
ABB.2: DIE PURIN- UND PYRIMIDINBASEN DER DNA.....	- 4 -
ABB.3: DIE BASENPAARUNG DER DNA .....	- 5 -
ABB.4: CHROMATIN .....	- 6 -
ABB.5: DAS NUKLEOSOM.....	- 7 -
ABB.6: DAS CHROMATOSOM .....	- 8 -
ABB.7: CHROMOSOM.....	- 9 -
ABB.8: MÖGLICHKEITEN VON MUTATIONEN.....	- 10 -
ABB.9: DIE WICHTIGSTEN ENDOGENEN UND EXOGENEN EINFLÜSSE UND DIE MÖGLICHEN ZELLULÄREN MECHANISMEN DER DNA-REPARATUR.....	- 11 -
ABB.10: VERSCHIEDENE DNA-SCHÄDEN .....	- 12 -
ABB.11: HOMOLOGE REKOMBINATION .....	- 15 -
ABB.12: NICHT-HOMOLOGE ENDVERKNÜPFUNG.....	- 16 -
ABB.13: AKTIVIERUNG VON GAMMAH2AX .....	- 18 -
ABB.14: ZELLZYKLUSVERLAUF .....	- 19 -
ABB.15: SIGNALWEG VON P53 .....	- 26 -
ABB.16: AKTIVIERUNG DES INTRA-S-KONTROLLPUNKTES .....	- 28 -
ABB.17: AKTIVIERUNG DES G2-KONTROLLPUNKTES .....	- 30 -
ABB.18: ABLAUF DES APOPTOSEPROZESSES .....	- 31 -
ABB.19: SCHEMATISCHER ABLAUF DER EXTRINSISCHEN UND INTRINSISCHEN SIGNALKASKADE DER APOPTOSE .....	- 33 -
ABB.20: STRUKTUR DER TOPOISOMERASE I .....	- 37 -
ABB.21: DER KATALYTISCHE ZYKLUS DER TOPOISOMERASE I .....	- 39 -
ABB.22: STRUKTUR DER TOPOISOMERASE II .....	- 41 -
ABB.23: DER KATALYTISCHE MECHANISMUS DER TOPOISOMERASE II .....	- 43 -
ABB.24: BEISPIEL DER INHIBIERUNG DES KATALYTISCHEN ZYKLUS DER HUMANEN TOPOISOMERASE II DURCH ETOPOSID, MERBARON, ICRF-187 UND ACLARUBICIN....	- 45 -
ABB.25: KATALYTISCHER TOPOISOMERASE-INHIBITOR VERSUS TOPOISOMERASE-GIFT ..	- 46 -
ABB.26: DIE LACTON- UND DIE CARBOXYLATFORM DES CAMPTOTHECINS .....	- 50 -
ABB.27: A) STRUKTURFORMEL VON DOXORUBICIN .....	- 51 -
B) STRUKTURFORMEL VON ETOPOSID .....	- 51 -
ABB.28: BEISPIELE FÜR KATALYTISCHE TOPOISOMERASE-HEMMSTOFFE .....	- 54 -
ABB.29: ZUSAMMENSPIEL VON HDAC UND HAT .....	- 57 -
ABB.30: STRUKTUR VON HDAC 8 MIT TRICHOSTATIN A .....	- 62 -
ABB.32: STRUKTUR VON SUMO 1 .....	- 63 -
ABB.33: ENZYMATISCHE KASKADE DER SUMOYLIERUNG.....	- 65 -
ABB.34: GRUPPIERUNG DER POLYPHENOLE IN PHENOLSÄUREN UND FLAVONOIDE .....	- 68 -
ABB.35: GRUNDSTRUKTUR DER FLAVONOIDE, FLAVAN.....	- 68 -
ABB.36: STRUKTUR VON KAFFEESÄURE UND CHLOROGENSÄURE (CGA).....	- 73 -
ABB.37: STRUKTURFORMEL VON GENISTEIN .....	- 74 -
ABB.38: STRUKTURFORMEL VON EGCG.....	- 75 -
ABB.39: STRUKTURFORMEL VON METHYLEUGENOL .....	- 76 -

ABB.40: BIOAKTIVIERUNG VON METHYLEUGENOL .....	85 -
ABB.41: EXEMPLARISCHER WESTERN BLOT ZUR DETEKTION VON SUMO E1 IN HT29 ZELLEN.....	94 -
ABB.42: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER SUMO E1 EXPRESSION IN DER A) KERNFRAKTION UND B) ZYTOSOLISCHEN FRAKTION VON HT29 ZELLEN NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT CHLOROGENSÄURE .....	97
ABB.43: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER SUMO E1 EXPRESSION IN DER A) KERNFRAKTION UND B) ZYTOSOLISCHEN FRAKTION VON HT29 ZELLEN NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT GENISTEIN.....	98
ABB.44: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER SUMO E1 EXPRESSION IN DER A) KERNFRAKTION UND B) ZYTOSOLISCHEN FRAKTION VON HT29 ZELLEN NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT EGCG .....	100
ABB.45: BEEINFLUSSUNG DER HDAC1 AKTIVITÄT IN HT29 ZELLEN NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT DEN POLYPHENOLEN EGCG, GENISTEIN UND CHLOROGENSÄURE IN ANWESENHEIT VON KATALASE (100 U/ML)..	102
ABB.46: WESTERN BLOT ANALYSE UND REPRÄSENTATIVE WESTERN BLOTS DER HDAC 1 EXPRESSION IN HT29 ZELLEN NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT DEN AUSGEWÄHLTEN POLYPHENOLEN IN ANWESENHEIT VON KATALASE (100 U/ML)..	103
ABB. 47: EINFLUSS VON A) CHLOROGENSÄURE, B) GENISTEIN C) EGCG NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION AUF DIE EXPRESSION VON SUMO E1- HDAC 1-KOMPLEXES NACH IMMUNPRÄZIPITATION .....	106
ABB.48: EINFLUSS VON METHYLEUGENOL AUF DIE ZELLWACHSTUMSHEMMUNG VON HT29 ZELLEN (SRB TEST).....	112
ABB.49: EINFLUSS VON 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL AUF DIE ZELLWACHSTUMSHEMMUNG VON HT29 ZELLEN (SRB TEST). ....	113
ABB.50: EINFLUSS VON METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID AUF DIE ZELLWACHSTUMSHEMMUNG VON HT29 ZELLEN (SRB TEST). ....	114
ABB.51: EINFLUSS VON 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL AUF DIE ZELLWACHSTUMSHEMMUNG VON HT29 ZELLEN (SRB TEST). ....	115
ABB.52: INDUKTION VON DNA-STRANGBRÜCHEN DURCH METHYLEUGENOL .....	121
ABB.53: INDUKTION VON DNA-STRANGBRÜCHEN DURCH 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL. ....	122
ABB.54: INDUKTION VON DNA-STRANGBRÜCHEN DURCH METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID .....	123
ABB.55: INDUKTION VON DNA-STRANGBRÜCHEN DURCH 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL ...	124
ABB.56: CHROMATOGRAM MITTELS HPLC VON 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL UND 3'-HYDROXYMETHYLISOEUGENOL NACH 0H, 1H & 24 H INKUBATION AN HT29 ZELLEN ..	126
ABB.57: INDUKTION VON DNA-STRANGBRÜCHEN DURCH 3'-HYDROXYMETHYLISOEUGENOL ...	127
ABB.58: HEMMUNG DER HDAC-AKTIVITÄT IN HT29 ZELLEN NACH EINER 24-STÜNDIGEN INKUBATION MIT METHYLEUGENOL UND METHYLEUGENOLMETABOLITEN. ....	136
ABB.59: PROTEINSTATUS VON HDAC 1 NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'OH-ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-Oxo-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE. ....	138
ABB.60: PROTEINSTATUS VON HDAC 2 NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'OH-ME),	

METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-OXO-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE. ....	140
ABB.61: PROTEINSTATUS VON HDAC 3 NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'-OH-ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-OXO-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE. ....	141
ABB.62: PROTEINSTATUS VON HDAC 4 NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'-OH-ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-OXO-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE. ....	142
ABB.63: PROTEINSTATUS VON HDAC 5 NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'-OH-ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-OXO-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE. ....	143
ABB.64: PROTEINSTATUS VON HDAC 6 NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'-OH-ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-OXO-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE. ....	144
ABB.65: MODULATION DER KATALYTISCHEN AKTIVITÄT DER TOPOISOMERASE I DURCH METHYLEUGENOL (ME) UND 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'-OHME) UNTERSUCHT IM RELAXATIONSASSAY. ....	148
ABB.66: MODULATION DER KATALYTISCHEN AKTIVITÄT DER TOPOISOMERASE I DURCH METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UNTERSUCHT IM RELAXATIONSASSAY. ....	149
ABB.67: MODULATION DER KATALYTISCHEN AKTIVITÄT DER TOPOISOMERASE I DURCH 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-OXOMIE) UNTERSUCHT IM RELAXATIONSASSAY. ....	150
ABB.68: MODULATION DER KATALYTISCHEN TOPOISOMERASE II DURCH METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'-OHME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE), 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-OXOMIE) UNTERSUCHT IM DEKATENIERUNGSASSAY. ....	153
ABB.69: EFFEKTE VON METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'-OH-ME) UND METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) AUF DIE STABILISIERUNG DES TOPOISOMERASE-I-DNA-KOMPLEXES IN HT29 ZELLEN (ICE-BIOASSAY). ....	155
ABB.70: EFFEKTE VON 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-OXO-MIE) AUF DIE STABILISIERUNG DES TOPOISOMERASE-I-DNA-KOMPLEXES IN HT29 ZELLEN (ICE-BIOASSAY). ....	156
ABB.71: EFFEKTE VON METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'-OH-ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL AUF DIE STABILISIERUNG DES TOPOISOMERASE-II-DNA-KOMPLEXE IN HT29 ZELLEN (ICE-BIOASSAY). ....	157
ABB.72: INDUKTION VON DNA-STRANGBRÜCHEN NACH PRÄ- UND COINKUBATION MIT METHYLEUGENOL. ....	159
ABB.73: INDUKTION VON DNA-STRANGBRÜCHEN NACH PRÄ- UND COINKUBATION MIT 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL. ....	160

ABB.74: EINFLUSS VON METHYLEUGENOL (ME) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-Oxo-MIE) AUF DIE RATE AN CAMPTOTHECIN (CPT) INDUZIERTER TOPOISOMERASE-I/DNA-KOMPLEXE..	162
ABB.75: PROTEINSTATUS VON GAMMAH2AX NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'OH-ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-Oxo-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE.	165
ABB.76: VERLAUF DER ATM/ATR-SIGNALKASKADE	169
ABB. 77: PROTEINSTATUS VON PHOSPHO-ATM (P-ATM) NACH 24-STÜNDIGER ... INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'OH- ... ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'- .. Oxo-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE.	171
ABB.78: PROTEINSTATUS VON PHOSPHO-ATR (P-ATR) NACH 24-STÜNDIGER ... INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'OH-ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-Oxo-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE.	172
ABB.79: PROTEINSTATUS VON PHOSPHO-ATM (P-ATM) NACH ZWEISTÜNDIGER . INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'OH- ... ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'- . Oxo-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE.	174
ABB.80: PROTEINSTATUS VON PHOSPHO-ATR (P-ATR) NACH ZWEISTÜNDIGER .. INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'OH- ... ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'- . Oxo-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE.	175
ABB.81: PROTEINSTATUS VON PHOSPHO-CHK1 (P-CHK1) NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'OH-ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-Oxo-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE.	177
ABB.82: PROTEINSTATUS VON PHOSPHO-CHK2 (P-CHK2) NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'OH-ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-Oxo-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE.	178
ABB.83: PROTEINSTATUS VON PHOSPHO-P53 NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'OH-ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-Oxo-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE.	180
ABB.84: PROTEINSTATUS VON PHOSPHO-BRCA1 (P-BRCA1) NACH 24-STÜNDIGER INKUBATION MIT METHYLEUGENOL (ME), 1'-HYDROXYMETHYLEUGENOL (1'OH-ME), METHYLEUGENOL-2',3'-EPOXID (MEE) UND 3'-OXOMETHYLISOEUGENOL (3'-Oxo-MIE) GEMESSEN MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE.	182
ABB.85: ZELLEN OHNE MYKOPLASMENBEFALL UND MIT MYKOPLASMENBEFALL	202
ABB.86: NEUBAUER-ZÄHLKAMMER	204
ABB.87: STRUKTURFORMEL VON TRYPANBLAU	204
ABB.88: A: NETZEINTEILUNG EINER NEUBAUER-ZÄHLKAMMER; B: ZÄHLWEISE	205



ABB.89: STRUKTURFORMEL VON SULFORHODAMIN B.....	209
ABB.90: FUNKTIONALITÄT DES FPG'S.....	213
ABB.91: ABLAUF DER ARBEITSSCHRITTE DER EINZELZELLGELELEKTROPHORESE .....	213
ABB.92: STRUKTURFORMEL VON COOMASSIE-BRILLANTBLAU G250 .....	223
ABB.94: CHEMOLUMINESZENZREAKTION .....	227
ABB.95: PRINZIP DER IMMUNPRÄZIPITATION .....	233
ABB.96: SCHEMATISCHE DURCHFÜHRUNG DES HDAC-AKTIVITÄTSASSAY .....	235
ABB.97: RELAXATION DER DNA DURCH TOPOISOMERASE I .....	240
ABB.98: DEKATENIERUNG DER kDNA DURCH TOPOISOMERASE II.....	243
ABB.99: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ICE-BIOASSAYS .....	246
ABB.100: AUFBAU EINER SLOT-BLOT APPARATUR.....	248

## Tabellenverzeichnis

TAB.1 : AUFLISTUNG DER PHOSPHORYLIERTEN ZIELENZYME ZUR G <sub>1</sub> -ARRETIERUNG .....	25 -
TAB.2: VORKOMMEN DER TOPOISOMERASEN.....	35 -
TAB.3: HDAC KLASSEN .....	56 -
TAB.4 : EINTEILUNG DER HDAC-INHIBITOREN .....	61 -
TAB.5: AUFLISTUNG EINIGER SUMO-SUBSTRATPROTEINE .....	66 -
TAB.6: VERSCHIEDENE LEBENSMITTEL UND EINE KLEINE AUSWAHL DER ENTHALTENEN POLYPHENOLE .....	69 -
TAB.7: AUFLISTUNG VERSCHIEDENER WIRKUNGEN VON POLYPHENOLEN .....	71 -
TAB.8: METABOLITE AUS GESAMMELTEN 24H-URIN.....	80 -
TAB.9: PHASE-I-METABOLITE .....	82 -
TAB.10: METABOLITE AUS LEBERMIKROSOMEN DER RATTE IN HOHEM UND NIEDRIGEM DOSISBEREICH.....	84 -
TAB.11: ZYTOTOXISCHE WIRKUNG VON METHYLEUGENOL UND AUSGEWÄHLTEN OXIDATIVEN METABOLITEN .....	119
TAB.12: SCHEMA DER VERWENDETEN ZELLZAHLEN .....	207
TAB.13: SCHEMA DER HERSTELLUNG DER 100 MM STAMMLÖSUNG .....	207
TAB.14: SCHEMA DER VERWENDETEN VERDÜNNUNGSREIHE.....	208
TAB.15: EINGESETZTE VOLUMEN ZUR ERREICHUNG DER ENDKONZENTRATION .....	208
TAB.16: STANDARDREIHE IM KONZENTRATIONSBEREICH VON 0,1-1,5 MG/ML BSA- STANDARDLÖSUNG.....	224
TAB. 17: ZUSAMMENSETZUNG DES TRENNGELS.....	228
TAB.18: ZUSAMMENSETZUNG DES SAMMELGELS .....	228
TAB.19: PRIMÄRANTIKÖRPER.....	230
TAB.20: PIPETTIERSHEMA FÜR RELAXATIONSASSAY .....	241
TAB.21: PIPETTIERSHEMA FÜR DEKATENIERUNGSASSAY .....	244
TAB.21: PRIMÄRANTIKÖRPER.....	250

## **Anhang**

- **Danksagung**
- **Veröffentlichungen**
- **Lebenslauf**

# Danksagung

## Ich danke

- ◆ Frau Junprof. Dr. M. Esselen für die Überlassung des interessanten Themas, die fördernde und zielführende Betreuung sowie die stetige Kommunikationsbereitschaft
- ◆ Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schrenk für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft
- ◆ Frau Prof. Dr. Doris Marko für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, während meines Forschungsaufenthaltes in Wien, die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft
- ◆ der Arbeitsgruppe Frau Melina Haben und Frau Sabrina Haupenthal
- ◆ der Arbeitsgruppe in Wien, im Besonderen Frau Anika Schröter, für die Unterstützung bei den Topoisomerase-Versuchen
- ◆ den Arbeitskreisen der Lebensmittelchemie für stetige Hilfsbereitschaft; Alexander Cartus für die Bereitstellung des 3'-Hydroxymethylisoeugenols
- ◆ den Forschungspraktikanten und Diplomanden Sabrina Vallicotti, Julia Kajzar, Chen Chen, Claudia Lüske, Olga Rudakovski und Kathrin Kunz
- ◆ dem Boehringer Ingelheim Fond für die finanzielle Unterstützung des Forschungsaufenthaltes in Wien
- ◆ dem Institut Danone Ernährung für Gesundheit e.V. für die finanzielle Unterstützung des "Polyphenol-Projektes"
- ◆ den „Korrekturlesern“ Herrn Alexander Fenke und Frau Sabrina Haupenthal
- ◆ meiner Familie für die Unterstützung während meines gesamten Studiums und der Promotion

## Veröffentlichungen

- |                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2012<br>Publikation                 | Food and Function<br>Groh IAM, Cartus AT, Vallicotti S, Kajzar J, Merz KH, Schrenk D, Esselen M. Genotoxic potential of methyleugenol and selected methyleugenol metabolites in cultured Chinese hamster V79 cells. [Food Funct. 2012; 3(4):428-36]                                                                                                                      |
| 2013<br>Publikation                 | Journal of Nutrition and Metabolism<br>Groh IAM, Chen C, Lüske C, Cartus AT, Esselen M. Plant polyphenols and oxidative metabolites of the herbal alkenylbenzene methyleugenol suppress histone deacetylase activity in human colon carcinoma cells. [J Nutr Metab. 2013; 2013:821082]                                                                                   |
| 2013<br>Publikation                 | Chemical Research of Toxicology<br>Solecki GM, Groh IAM, Kajzar J, Haushofer C, Scherhag A, Schrenk D, Esselen M. Genotoxic properties of cyclopentenone prostaglandins and the onset of glutathione depletion. [Chem Res Toxicol. 2013; 26(2):252-61]                                                                                                                   |
| 30.03.2011-01.04.2011<br><br>Poster | 77.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT) in Frankfurt am Main<br>Groh IAM, Cartus AT, Merz K-H, Esselen M. DNA strand breaking properties of oxidative methyleugenol metabolites in V79 cells. [veröffentlicht in Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2011), 383, 1-112, Springer Verlag] |
| 12.09.2011-14.09.2011<br><br>Poster | 40.Lebensmittelchemikertagung der Gesellschaft Deutscher Chemiker in Halle (Saale)<br>Cartus AT, Groh IAM, Weishaupt LW, Merz K-H, Esselen M, Schrenk D. <i>In vitro</i> Metabolismus von Methyleugenol (ME): Identifizierung, Quantifizierung, Zytotoxizität und Genotoxizität hepatischer Metaboliten. [veröffentlicht in Lebensmittelchemie, Wiley]                   |
| 11.03.2012-15.03.2012<br><br>Poster | The Society of Toxicology (SOT) 51st Annual Meeting in San Francisco<br>Cartus AT, Groh I, Weishaupt LW, Merz KH, Esselen M, Schrenk D. In vitro Metabolism of Methyleugenol (ME) and Methylisoeugenol (MIE): Identification, Quantification and Cytotoxicity of Hepatic Metabolites.                                                                                    |

17.06.2012-20.06.2012	Kongress der European Societies of Toxicology (Eurotox) in Stockholm (Schweden)
Poster	Cartus AT, Herrmann K, Groh I, Weishaupt LW, Merz KH, Engst W, Glatt H, Esselen M, Schrenk D. Toxicological Properties of Methyleugenol and Methylisoeugenol Metabolites.
05.03.2012-06.03.2012	Regionaltagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft in Kaiserslautern
Poster	Vallicotti S, Groh I, Cartus A, Esselen M. DNA-strang-brechendes Potential verschiedener Asarone in V79-Zellen. [veröffentlicht in Lebensmittelchemie, Wiley]
19.03.2012-22.03.2012	78.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT) in Dresden
Poster	Groh IAM, Chen C, Esselen M. Dietary polyphenols affect SUMO and HDAC expression in human colon carcinoma cells [veröffentlicht in Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2012), 385, 1-116, Springer Verlag]
05.03.2013-07.03.2013	79.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT) in Halle (Saale)
Poster	Groh IAM, Löschmann T, Rudakovski O, Esselen M. Impact of methyleugenol and selected methyleugenol metabolites on histone deacetylase (HDAC) activity and HDAC expression [veröffentlicht in Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol (2013), 387, 1-112, Springer Verlag]
01.09.2013-04.09.2013	49. Kongress der European Societies of Toxicology (Eurotox) in Interlaken (Schweiz)
Poster	Groh IAM, Schröter A, Marko D, Esselen M. Selected methyleugenol metabolites suppress topoisomerase I activity and diminish the DNA-damaging properties of the DNA-topoisomerase poison camptothecin in human colon carcinoma cells. [veröffentlicht in Toxicology Letters]

01.04.2014-04.04.2014	80.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT) in Hannover
Poster	Groh IAM, Schröter A, Marko D, Esselen M. Selected methyleugenol metabolites suppress topoisomerase I activity and one metabolite acts as a catalytic topoisomerase I inhibitor in human carcinoma cells [veröffentlicht in Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, Springer Verlag]
05.03.2012-06.03.2012	Regionaltagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft in Kaiserslautern
Vortrag	Groh IAM, Kajzar J, Cartus A, Merz K-H, Esselen M. Genotoxizität von Methyleugenol und ausgewählter oxidativer Metaboliten <i>in vitro</i> . [veröffentlicht in Lebensmittelchemie, Wiley]
05.03.2012-06.03.2012	Regionaltagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft in Kaiserslautern
Vortrag	Cartus AT, Groh IAM, Herrmann K, Weishaupt LW, Engst W, Merz KH, Esselen M, Glatt H, Schrenk D. <i>In vitro</i> Metabolismus ausgewählter Phenylpropanoide: Identifizierung, Quantifizierung, Zytotoxizität und Genotoxizität hepatischer Metaboliten. [veröffentlicht in Lebensmittelchemie, Wiley]
19.03.2013-20.03.2013	Regionaltagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft in Karlsruhe
Vortrag	Groh IAM, Rudakovski O, Esselen M. Beitrag der zellulären Histondeacetylasen zum DNA-strangbrechenden Potential oxidativer Methyleugenolmetabolite. [veröffentlicht in Lebensmittelchemie, Wiley]
28.06.2013	Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung e.V.(GUM) Workshop „Nachwuchsförderung“ in Mainz
Vortrag	Groh IAM, Rudakovski O, Schröter A, Marko D, Esselen M. Topoisomerase I inhibition by the oxidative methyleugenol metabolite 3'-oxo methylisoeugenol and its impact on cell cycle progression in human colon carcinoma cells.

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Daten**

Name

Groh

Vorname

Isabel Anna Maria

## **Schulische Ausbildung**

02.1992 – 07.1996

Grundschule in Otzenhausen

07.1996 – 03.2005

Gymnasium Hermeskeil; Abschluss Abitur

## **Studium**

10.2005 – 10.2009

Technischen Universität Kaiserslautern

Studiengang

Wirtschaftschemie

10.2009 – 03.2011

Technische Universität Kaiserslautern

Studiengang

Chemie

Vertiefungsrichtung

Life Science in Chemistry (Lebensmittelchemie & Toxikologie)

08.2010- 03.2011

Diplomarbeit mit dem Thema „Untersuchungen zur Genotoxizität und Mutagenität von Methyleugenol und den oxidativen Metaboliten“ bei Juniorprof. Dr. M. Esselen

29.03.2011

Abschluss Diplom

05.2011 - 02.2014

Promotion an der TU Kaiserslautern bei Juniorprof. Dr. M. Esselen



## Praktikum

11.2009 – 03.2010

Forschungspraktikum an der Technischen Universität  
Kaiserslautern Fachbereich

Lebensmittelchemie/Toxikologie AG Prof. Dr. Richling  
mit dem Thema „Bestimmung des zytosolischen und  
zellassozierten Gehalts an Polyphenolen in T84-  
Zellen“

## Forschungsaufenthalt

07.2012-09.2012

Universität Wien, Fachbereich Lebensmittelchemie  
und Toxikologie AG Prof. Dr. Marko mit dem Thema  
„Alkenylbenzenes and its respective metabolites as  
inhibitors of topo-isomerases and their impact on  
DNA-integrity“ [Boehringer Ingelheim Travel Grant]

10.2013

Universität Wien, Fachbereich Lebensmittelchemie  
und Toxikologie AG Prof. Dr. Marko mit dem Thema  
„3' oxo methylisoeugenol as suppressor of the  
cleavable complex formation by camptothecin“.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Die eingereichte Dissertation habe ich selbstständig verfasst und alle für die Arbeit benutzten Hilfsmittel genannt.

Weder die Dissertation noch Teile davon wurden jemals bei einem anderen Fachbereich eingereicht.

Ich habe zuvor noch kein Promotionsverfahren bei einer anderen Hochschule beantragt.

Kaiserslautern, den 05.05.2014

---

Isabel Groh